

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de una metodología para la cría en cautividad de la rana patilarga y el sapo partero común con vistas a su reintroducción en el Macizo de Peñalara

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Bárbara Martín Beyer

Directores

**José Manuel Serrano Talavera
Luis Revuelta Rueda**

**Madrid
Ed. electrónica 2019**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de una metodología para la cría en cautividad
de la rana patilarga y el sapo partero común con vistas a
su reintroducción en el Macizo de Peñalara

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Bárbara Martín Beyer

DIRECTORES

José Manuel Serrano Talavera

Luis Revuelta Rueda

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Desarrollo de una metodología para la cría en cautividad
de la rana patilarga y el sapo partero común con vistas a
su reintroducción en el Macizo de Peñalara**

Madrid, 2018

El Doctorando

Bárbara Martín Beyer

VºBº de los directores

José Manuel Serrano Talavera

Luis Revuelta Rueda

Esta Tesis ha sido financiada a través de dos contratos en el Centro de Cría en Cautividad de Anfibios amenazados de la Sierra de Guadarrama, dependiente de la Comunidad de Madrid, y un contrato en el proyecto “RACE, Risk Assessment of Chytridiomycosis to European Amphibian Biodiversity”, Proyecto FP7 ERA- NET Biodiveresa.

A mis padres y a quienes han creído en mí

Dijo a la rana el mosquito
desde una tinaja:
«Mejor es morir en el vino
que vivir en el agua»,
pues que mi muerte disfamas;
y si borracho me llamas,
yo te llamaré aguanosa.

Don Francisco de Quevedo

AGRADECIMIENTOS

Quizá sean estas las páginas más difíciles de escribir de todas, aquellas en las que reconoces que, como bien escribió John Donne en el siglo XVII, no eres una isla entera en ti misma, sino que eres una porción de un continente, y que sin el apoyo de otras “islas”, nada de esto hubiera sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a parte de quienes dedico esta tesis, mis dos directores, Luis y José. Tras una navegación turbulenta por el mar del doctorado en el cual me ahogaba, me lanzaron un buen salvavidas, me subieron a bordo, y me reeducaron en el valor del compromiso y de la creencia en mi misma. Sin su apoyo y sin su desinteresada ayuda no sería posible depositar esta Tesis. Me habéis enseñado que sigue habiendo gente que se preocupa por otras personas. ¡Gracias!

A Juan Vielva, director del que en su día fuera el Parque Natural de Peñalara, que creyó en un proyecto de conservación de anfibios, y que junto a Jaime Bosch, han hecho del Macizo de Peñalara un lugar de estudio de ámbito mundial.

A mis padres, mis compañeros incansables en este largo viaje. Me han apoyado, ayudado, apoyado y vuelto a ayudar....si esto no es suerte, no sé qué puede serlo. Son mis consejeros en la vida, y tengo la inmensa suerte de ser su hija. Ich liebe euch!

A mis hermanos Dani, Mimi, Karlita y Pa y sus pequeños retoños, que me han enseñado a mirar hacia adelante pese a las adversidades, me han apoyado y para qué negarlo, me han sufrido. Os quiero ¡Gracias por todo!

A mis X-Man, mi “comando granja” particular: Beto, Vic, Twis, Juan, Antonio, Nacho y Murillen. No han existido mejores amigos que ellos, siempre creyendo en mis posibilidades y haciendo que vea el lado divertido de la vida. Me han enseñado a reírme de mi misma, el mejor regalo que jamás se pueda recibir. ¡Gracias!

A mi pequeña patata manchega Done, mi gran amor. Es la mujer que me soporta pacientemente, que me ama sin condiciones y responsable, en parte, de haber terminado todo este embrollo sin haber perdido la cabeza. Es un sueño hecho realidad. ¡Te quiero!

A mi fiel soldadesca de la Operación Burbuja, Deivid e Ivanxo, con los que he disfrutado de aventuras de papel y plástico, y con los que sigo haciéndolo. ¡Sois geniales!

A todos los que me dejo sin mencionar como es debido, lo que me llevaría por otro lado, otra Tesis: el *Homo peñalarensis*, conjunto de seres que habitan el Macizo ataviados con sombrero, gafas, botas de montaña y un sonrisa, a Juan Carlos, Peter, Mariajo, Ana.....sois muchos y el espacio, pequeño.

¡Gracias a todos y nos vemos en las charcas!

Püppy

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	25
SITUACIÓN ACTUAL Y PRINCIPALES AMENAZAS PARA LOS ANFIBIOS EN ESPAÑA.....	27
PRINCIPALES FACTORES RESPONSABLES DEL DECLIVE DE LAS POBLACIONES DE ANFIBIOS..	28
La quitridiomycosis	29
Introducción de especies alóctonas: el caso de los salmónidos	32
Sinergia entre los factores responsables del declive	33
PROGRAMAS DE RECUPERACIÓN DE ANFIBIOS EN ESPAÑA.....	34
La traslocación como herramienta de recuperación de poblaciones amenazadas	35
Programas de cría <i>ex situ</i> en España	35
Limitaciones de los programas <i>ex situ</i> de cría.....	38
SITUACIÓN DE LAS POBLACIONES DE ANFIBIOS DEL MACIZO DE PEÑALARA HASTA 2008....	39
Sapo partero común.....	40
Rana patilarga.....	42
Declive del sapo partero común y la rana patilarga en el Macizo de Peñalara	43
MEDIDAS DE PROTECCIÓN REALIZADAS EN EL MACIZO DE PEÑALARA HASTA 2008.....	46
Declaración de zonas de máxima protección de anfibios y creación de puntos de reproducción	46
Pesca eléctrica.....	47
Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama.....	48
ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN LA CRÍA EN CAUTIVIDAD	51
Enriquecimiento ambiental larvario.....	52
Enriquecimiento ambiental juvenil	53
Enriquecimiento ambiental en adultos	54
Diferenciación sexual en la colonia cautiva	56
Hibernación	56
Tratamiento <i>in situ</i> de la quitridiomycosis.....	57
Reintroducción de los ejemplares producidos.....	58
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	64
MAXIMIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS EJEMPLARES CRIADOS Y MINIMIZACIÓN DEL ESFUERZO HUMANO DE CRÍA	66
1) Optimización de la cría y del tamaño larvario	66
2) Optimización de la cría y del tamaño de los juveniles	69

PRODUCCIÓN DE EJEMPLARES EN CAUTIVIDAD	71
I. Discriminación sexual en sapo partero común	71
II. Hibernación del sapo partero común.....	73
DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO <i>IN SITU</i> EFECTIVO FRENTE A LA QUITRIDIOMICOSIS	77
REINTRODUCCIÓN DE LOS EJEMPLARES PRODUCIDOS Y CONFIRMACIÓN DE SU VIABILIDAD	79
I. Reintroducción de <i>A. obstetricans</i>	79
II. Reintroducción de <i>R. iberica</i>	80
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	82
Experimentación con larvas de <i>A. obstetricans</i>	82
Experimentación con larvas de <i>R. iberica</i>	82
Experimentación con juveniles de <i>A. obstetricans</i>	83
Experimentación con juveniles de <i>R. iberica</i>	83
Discriminación sexual en adultos de sapo partero común	83
Hibernación del sapo partero común	83
Desarrollo de un tratamiento <i>in situ</i> efectivo frente a la quitridiomicosis.....	83
Reintroducción de los ejemplares de rana patilarga producidos: selección de hábitat	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	86
MAXIMIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS EJEMPLARES CRIADOS Y MINIMIZACIÓN DEL ESFUERZO HUMANO DE CRÍA	88
1) Optimización de la cría y del tamaño larvario	89
2) Optimización de la cría y del tamaño de los juveniles	96
PRODUCCIÓN DE EJEMPLARES EN CAUTIVIDAD	101
I. Discriminación sexual en <i>A. obstetricans</i>	102
II. Hibernación	105
DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO <i>IN SITU</i> EFECTIVO FRENTE A LA QUITRIDIOMICOSIS ..	109
REINTRODUCCIÓN DE LOS EJEMPLARES PRODUCIDOS Y CONFIRMACIÓN DE SU VIABILIDAD	111
Reintroducción de <i>A. obstetricans</i>	112
Reintroducción de <i>R. iberica</i>	114
Estrategias en los programas de reintroducción.....	118
IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES EN LAS INSTALACIONES DEL CENTRO DE CRÍA EN CAUTIVIDAD.....	122
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA.....	133
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii



Introducción

SITUACIÓN ACTUAL Y PRINCIPALES AMENAZAS PARA LOS ANFIBIOS EN ESPAÑA

España posee aproximadamente el 50% de la riqueza de plantas y vertebrados de Europa, y al menos un 30% de sus endemismos (Araújo *et al.* 2007). El esfuerzo realizado desde las instituciones y los gobiernos por catalogar y evaluar el estatus de conservación de la fauna y flora de España, ha favorecido la publicación de numerosos catálogos entre los que se incluye el Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España publicado en 2002. Según éste, en los últimos 10 años el número de especies amenazadas en estos dos taxones ha aumentado un 62% (Pleguezuelos *et al.* 2002), siendo este registro mayor que para otros taxones como mamíferos o aves (Beebee & Griffiths 2005) y observándose mundialmente (Collins & Storer 2003).

Los anfibios son esenciales por dos razones: primero porque cumplen un rol importante en los ecosistemas en los que habitan, contribuyendo a la cadena trófica en calidad de depredadores y presas (Blaustein & Kiesecker 2002); y segundo porque su desarrollo larvario acuático y, en la mayoría de los adultos, su vida terrestre, les convierte en buenos bioindicadores (Blaustein & Kiesecker 2002). Así, su protección frente a este alarmante declive requiere una combinación de medidas *in situ* y *ex situ* (O'Donnell *et al.* 2017), y la promulgación de leyes es una herramienta fundamental. Actualmente existen tres leyes bajo cuyo paraguas quedan protegidas las especies y sus hábitats:

- 1) La Directiva Hábitat 92/43/CEE, que tiene dos vías de acción: por un lado la Red Natura 2000, y por el otro la protección de especies a través del seguimiento y actualización del estatus de conservación de especies de importancia ecológica. A pesar de que el 20% del territorio español está incluido en la Red Natura 2000, los hábitats importantes para los anfibios se hayan poco representados (Araújo *et al.* 2007), y en el 2012, acorde a Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), tan sólo un 11% de los espacios protegidos habían implementado sus planes de gestión (WWF 2012).
- 2) La Directiva Marco para el Agua, aprobada en el 2000, que protege aguas continentales con el fin de reducir y prevenir su contaminación, mejorar el hábitat y minimizar los efectos de las sequías y las inundaciones. Desgraciadamente, esta directiva protege masas de agua cuya superficie es superior a 50 ha., quedando desprotegidas otras masas de menor entidad y que son igualmente importantes para las comunidades de anfibios (WWF 2012)
- 3) La Ley de Patrimonio y Diversidad 42/2007, que protege todas las poblaciones de anfibios y que incluye además un Catálogo Nacional de Especies Amenazadas y una Lista de Especies Protegidas, y en la que se incluyen 28 de las 35 especies de anfibios del

territorio nacional. Adicionalmente, cada Comunidad Autónoma puede desarrollar su propio Catálogo Regional de Especies Amenazadas, aunque tan sólo algunas los han actualizado (WWF 2012). Esto ha propiciado que las especies descritas recientemente no hayan quedado incluidas en dichas listas, o que especies otrora consideradas poblaciones reliquia y actualmente consideradas invasoras, se hallen protegidas.

Complementando la legislación vigente se han llevado a cabo actuaciones encaminadas a restaurar hábitats degradados. A pesar de ello, la situación de los anfibios en España es crítica, y actualmente no se ha propuesto ni desarrollado ninguna estrategia nacional de conservación, y numerosas partidas presupuestarias se han destinado a otros taxones (Rummel *et al.* 2016). Quizá su pequeño tamaño, su facilidad para pasar desapercibidos y la aversión que pueden provocar en la sociedad, haya limitado la alarma social concerniente a su declive y la protección institucional de sus poblaciones (Ceríaco 2012). Sin ir más lejos, fue durante el Primer Congreso Mundial de Herpetología de 1989, cuando se planteó por primera vez la existencia de un patrón de declive generalizado en los batracios (Alford & Richards 1999).

PRINCIPALES FACTORES RESPONSABLES DEL DECLIVE DE LAS POBLACIONES DE ANFIBIOS

Evaluar el declive de las poblaciones de anfibios es difícil debido a la fluctuación natural de las mismas como respuesta a los cambios ambientales y a las diferentes amenazas que afrontan (Griffiths & Pavajeau 2008). Tradicionalmente se han identificado una serie de factores responsables del declive como son la pérdida y degradación del hábitat, el cambio climático, la contaminación o el comercio legal e ilegal de especies (Beebee & Griffiths 2005).

Pérdida y degradación del hábitat

Quizá este sea uno de los factores más documentados en el que la pérdida de hábitat reduce la abundancia y diversidad anfibia del área afectada (Alford & Richards 1999). La deforestación, el drenaje de zonas húmedas, la modificación del hábitat por intereses urbanísticos, etc., ha fragmentado y reducido las poblaciones de anfibios, conllevando la desaparición de numerosas especies en el mundo (Denton *et al.* 1997; Arntzen *et al.* 2017)

Cambio climático

El cambio climático global y su implicación en la extinción de especies se ha convertido en uno de los factores que mayor interés suscita. Las condiciones climáticas inusuales pueden generar

estrés en las poblaciones de anfibios, especialmente si su efecto se extiende durante múltiples años (Alford *et al.* 2007). Su incidencia, a nivel local o regional, puede ser directa o indirecta. Indirectamente puede alterar el hábitat, la disponibilidad de alimento, los patrones de distribución o alterar la red de interacciones interespecífica (Blaustein *et al.* 2010). Directamente, puede alterar la tasa de supervivencia, reproducción, desarrollo o comportamiento (Blaustein *et al.* 2010).

Contaminación

El empleo de herbicidas, pesticidas y otros compuestos químicos que intencionada o accidentalmente se han vertido en las cuencas hidrográficas, puede alterar dramáticamente la distribución, la reproducción y la viabilidad de la reproducción (Alford & Richards 1999; Blaustein & Kiesecker 2002a).

Comercio de especies

El comercio legal o ilegal de especies, y su sobrexplotación está amenazando muchas especies de anfibios (Schlepfer *et al.* 2005). En este comercio, pocas especies de anfibios en comparación con las especies de reptiles, están reguladas por el Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES: *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), siendo comercializadas principalmente como alimento o como mascotas (Schlepfer *et al.* 2005).

Desafortunadamente, la introducción de especies alóctonas, facilitada por la permeabilidad de las fronteras (Keulartz 2015), y las enfermedades emergentes (*i.e* enfermedades de reciente aparición) se han sumado a este elenco de amenazas. De entre estas últimas, cabe destacar por su impacto, la quitridiomycosis y la introducción de salmónidos.

La quitridiomycosis

Entre las enfermedades emergentes que más preocupan a la comunidad científica por su incidencia y virulencia está la quitridiomycosis, producida por el hongo quitridio patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, descrito para la ciencia por Longcore, Pessier y Nichols en 1999 y que denominaremos *Bd* en adelante. Recientemente ha sido incluida en la lista internacional de enfermedades por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE: *World Organisation for Animal Health*), asociado al tráfico internacional de especies y la introducción de especies

invasoras susceptibles de ser vectores de la enfermedad, como la rana toro americana *Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802 (Kilpatrick *et al.* 2010; Peel *et al.* 2012).

En la actualidad se han identificado diferentes cepas de este hongo (Berger *et al.* 2005). La más importante, por su virulencia y su alta resistencia, se denomina lineaje panzootico global (*BdGPL*) y se encuentra distribuía mundialmente, siendo responsable de las principales mortandades observadas por todo el mundo (Farrer *et al.* 2011). *Bd* se caracteriza porque puede vivir tanto saprófitamente, como parasitando las regiones queratinizadas de los anfibios. Así, el hongo permanece en el disco oral de las larvas (única parte queratinizada de las mismas), actuando como reservorio de la enfermedad cuando el número de hospedadores es bajo (Daszak *et al.* 1999), y hasta que ésta completa la metamorfosis. En este momento la queratina comienza a producirse por toda la piel del anfibio, extendiéndose con ello la enfermedad (Bosch 2003; Johnson & Speare 2003), y conllevando la muerte del ejemplar infectado debido a una alteración del equilibrio osmótico de la piel (Voyles *et al.* 2009). Los individuos infectados pero que no sucumben a la enfermedad, pueden ver disminuido su *fitness* (Chatfield *et al.* 2013), reduciendo así su probabilidad de supervivencia. Los estudios sobre la fisiología de *Bd* muestran que sus zoosporas tienen una movilidad reducida (Piotrowski *et al.* 2004) y alcanzan la fase estacionaria a temperaturas de entre 17-23 °C. Por encima de 28 °C y por debajo de 10 °C su crecimiento es muy limitado, llegando a interrumpirse. Piotrowski *et al.* (2004) observaron que el 50% de las réplicas del hongo morían tras someterlas ocho días consecutivos a 30 °C. Así mismo, se han constatado diferencias en el crecimiento y reproducción dependiendo del origen de *Bd*, lo que sugiere que podrían existir adaptaciones locales (Stevenson *et al.* 2013).

La quitridiomycosis es responsable de numerosos declives y extinciones de batracios en el mundo (Bosch *et al.* 2001; Briggs *et al.* 2005; Bosch & Martínez-Solano 2006b) y actualmente es muy difícil de eliminar del medio natural (Imasuen *et al.* 2011). Tan sólo se ha registrado un caso en Mallorca, donde se consiguió eliminar en masas de agua aisladas (Bosch *et al.* 2015). Así, las principales estrategias de conservación adoptadas son los tratamientos *in situ* y la cría en cautividad.

1. Tratamientos in situ

Entre los tratamientos *in situ*, caben destacar por un lado los antifúngicos, y por otro el tratamiento con temperaturas elevadas. Entre los antifúngicos empleados destacan el Itraconazol, el Cloranfenicol y el Metil-tiofanato.

- El Itraconazol es un azol ampliamente usado en la cría en cautividad de anfibios (Pessier & Mendelson 2009), y se ha empleado con éxito en el tratamiento de la quitridiomycosis

(Garner *et al.* 2009; Woodhams *et al.* 2011), aunque se ha asociado a episodios de toxicidad en larvas y recién metamórficos (Garner *et al.* 2009; Pessier & Mendelson 2009) y se desconoce su toxicidad a largo plazo.

- El cloranfenicol, si bien se ha empleado con éxito en adultos (Bishop *et al.* 2009), se ha relacionado con la anemia aplásica en humanos (Pessier & Mendelson 2009), y se desconoce el efecto que pudiera tener en anfibios.
- El Metil-tiofanato se emplea como pesticida en todo el mundo, y diversos experimentos han corroborado su éxito en el tratamiento de larvas infectadas de anfibios, observándose adicionalmente un aumento de la masa y el tamaño larvario (Hanlon *et al.* 2012).

La temperatura se ha usado como tratamiento frente a la quitridiomycosis ya que se ha observado que la prevalencia y la intensidad de la infección están condicionadas en el medio natural por las temperaturas elevadas (Becker *et al.* 2012). Así, Woodhams *et al.* (2003), emplearon con éxito temperaturas elevadas para curar la infección, al igual que Chatfield & Richards-Zawacki (2011), que si bien no consiguieron eliminar la infección, alcanzaron un 96% de efectividad en el tratamiento.

II. Cría en cautividad

Los proyectos de recuperación de fauna y flora normalmente hacen frente a dos escenarios diferentes, con dos aproximaciones conservacionistas también diferentes aunque complementarias:

- 1) Cuando las amenazas pueden controlarse, se tiende a traslocar individuos, definido por la Comisión de Supervivencia de especies, perteneciente a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN/SSC: *International Union for Conservation of Nature/ The Species Survival Commission*) como el movimiento de organismos vivos, mediado por el ser humano, de un área a otra (IUCN/SSC 2013).
- 2) Cuando las amenazas no pueden controlarse, se requiere la cría en cautividad, definida a su vez como el mantenimiento de un animal en condiciones no naturales y gestionado por el ser humano (IUCN/SSC 2014).

El número de programas de cría en cautividad ha crecido un 56% en las últimas décadas (Harding *et al.* 2016), empleándose tanto para asegurar la supervivencia de una población amenazada, como para evitar una futura extinción (llamado rescate temporal) (IUCN/SSC 2014), y siendo su uso especialmente recomendado en poblaciones pequeñas y aisladas (Semlitsch 2002). Aunque tradicionalmente han sido los zoológicos las instituciones encargadas de desarrollar estos

programas, sus limitaciones económicas y de espacio, y su clara orientación comercial (Biega *et al.* 2017), ha llevado a otras instituciones conservacionistas a recoger el testigo (Bowkett 2009; Harding *et al.* 2016). De hecho, sólo el 45.5% de los programas de cría *ex situ* de anfibios se han desarrollado en zoológicos, siendo el mismo porcentaje aplicable para centros de cría promovidos con dinero público u organizaciones no gubernamentales (Harding *et al.* 2016).

Introducción de especies alóctonas: el caso de los salmónidos

La introducción de especies alóctonas está teniendo consecuencias dramáticas para las comunidades de anfibios (Knapp & Matthews 1998). Los peces se han convertido en uno de los taxones más introducidos del mundo (Gozlan *et al.* 2010), lo que ha conllevado la desaparición de numerosas poblaciones animales, ya que pueden transmitir enfermedades, hibridar, alterar el hábitat, competir con especies autóctonas o depredar (Gozlan *et al.* 2010; Britton *et al.* 2011; Caudron & Champigneulle 2011; Eilers *et al.* 2011). Los salmónidos, y en especial las truchas, han sido ampliamente introducidos para la pesca deportiva en América y Europa, alcanzando poblaciones estables y colonizando nuevos hábitats (Peterson *et al.* 2004; Britton *et al.* 2011). Su irrupción ha conllevado la alteración de la abundancia y distribución de las comunidades de anfibios (Vredenburg 2004), reduciendo la capacidad natural de éstos para colonizar nuevos hábitats (Ryan *et al.* 2014).

A diferencia de la quitridiomycosis, existen numerosos ejemplos en la literatura de peces alóctonos introducidos y erradicados (Knapp & Matthews 1998; Vredenburg 2004; Britton *et al.* 2009; Eilers *et al.* 2011). A pesar de la variedad de métodos disponibles para minimizar el impacto ecológico en el hábitat en el que son introducidos, el control de sus poblaciones está limitado por los intereses económicos y sociales que subyacen a dichas introducciones, y por el daño colateral que tiene en la fauna local (Britton *et al.* 2011). Así, una de las herramientas más usadas y con menor daño en la fauna local es la pesca eléctrica. Su efectividad varía en función del tamaño de la especie a capturar y de la complejidad del hábitat, siendo recomendado en el caso de hábitats sencillos con arroyos pequeños (Kulp & Moore 2000; Meyer *et al.* 2006). Adicionalmente, la tasa de inmigración y la facilidad de pesca de la especie influyen en su éxito (Peterson *et al.* 2008). Otros métodos usados con éxito son la pesca pasiva mediante redes (Knapp & Matthews 1998; Eilers *et al.* 2011), o mediante agentes biocidas, como la rotenona o la antimicina (Gresswell 1991; Eilers *et al.* 2011), aunque su empleo suscita gran controversia en la sociedad.

Sinergia entre los factores responsables del declive

La identificación y la neutralización (al menos parcial) de los factores que amenazan una comunidad de anfibios son pasos primordiales en cualquier programa cuyo objetivo sea la recuperación de una población amenazada (Dodd & Seigel 1992; Gagliardo *et al.* 2008; Williams & Hoffman 2009). Así, se ha sugerido que la mejor vía para conseguirlo es disminuyendo la exposición y aumentando la resistencia de la población a dichos factores (Harding *et al.* 2016). El problema radica en que, normalmente, éstos actúan en sinergia, siendo por tanto más difíciles de identificar y eliminar (Blaustein & Kiesecker 2002). La importancia dada por la comunidad científica a estas interacciones ha ido en aumento (Collins & Storfer 2003), y según Blaustein & Kiesecker (2002) existen diferentes medios a través de los cuales las sinergias afectan a los anfibios: 1) cuando una población ve mermada su capacidad de responder a un factor en presencia de un segundo; 2) cuando un factor aumenta la toxicidad del otro.

La figura 1 es un ejemplo simple basado en Blaustein & Kiesecker (2002), donde se muestra una posible red de interacciones sinérgicas entre dos amenazas: por un lado la introducción de una especie depredadora (por ejemplo un pez), y por otro la introducción de una especie que puede competir y/o depredar sobre alguno de los estadios de desarrollo (por ejemplo, otra especie anfibia invasora). Ambos factores alteran la distribución del hábitat de la especie nativa, conllevando una disminución de las posibilidades de supervivencia, del crecimiento y del desarrollo larvario.

Las causas del declive de los anfibios son complejas, pudiendo diferir entre especies, poblaciones o incluso estadios de desarrollo (Blaustein *et al.* 2011). Así, encontrar soluciones óptimas se vuelve a su vez complejo (Bowkett 2009; Mendelson III & Altig 2015), y requiere que la comunidad científica, las instituciones y los gobiernos aúnen sus esfuerzos (Tapley *et al.* 2017). Sin embargo, las discrepancias entre los científicos, la ausencia de conocimiento básico, o la inactividad política entorpecen la búsqueda de recursos y medios y, en definitiva, disminuye las posibilidades de recuperación de una población amenazada (Muths & Fisher 2017; O'Donnell *et al.* 2017; Walls *et al.* 2017). Sumado a la dependencia del medio que tienen los anfibios y su poco poder de colonización, hace de este taxón un elemento vulnerable en los ecosistemas donde habita (Michaels *et al.* 2014; Carter *et al.* 2017).

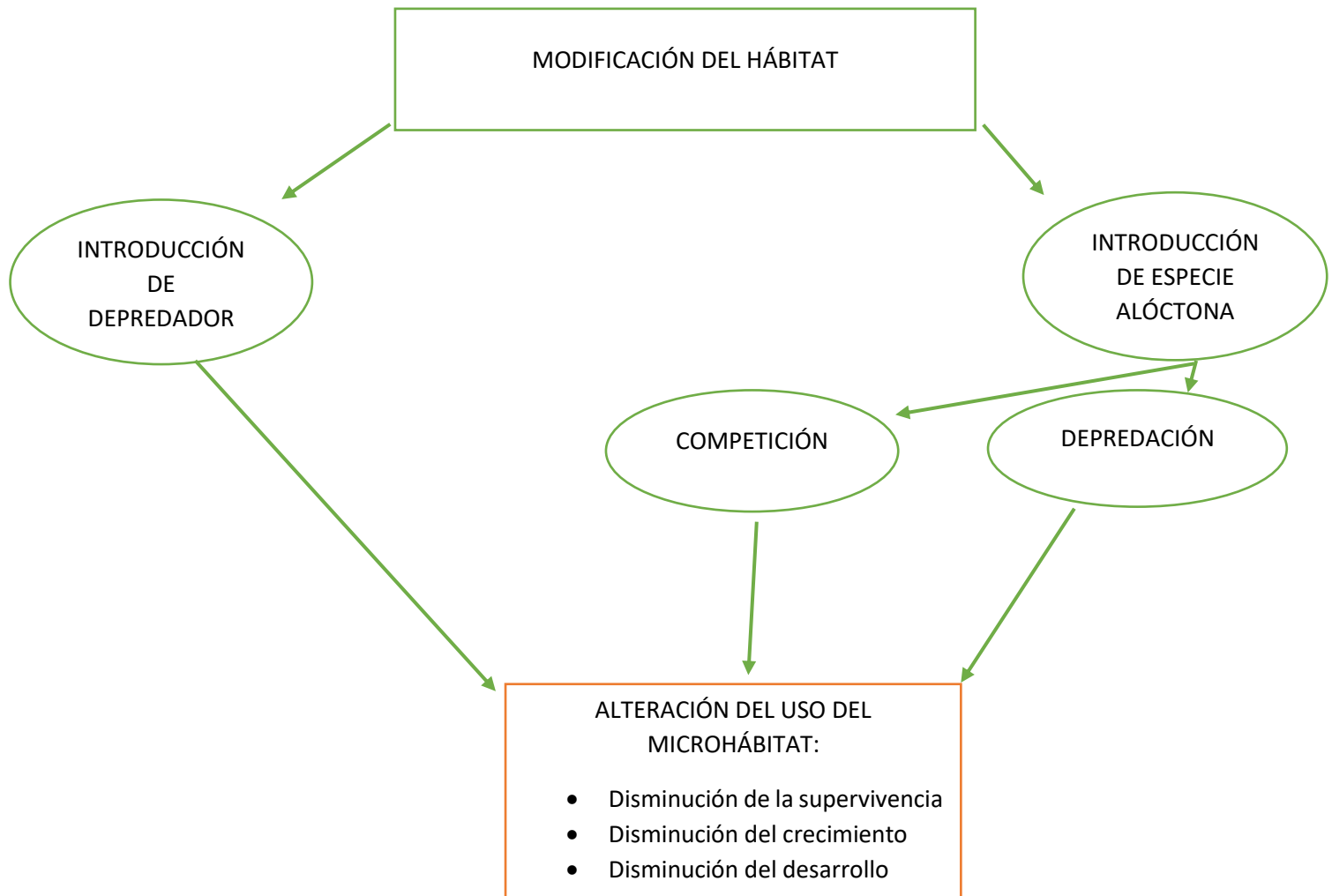


Figura 1: Ejemplo de una posible sinergia entre dos factores que amenazan una población anfibia y sus consecuencias (Blaustein & Kiesecker 2002).

PROGRAMAS DE RECUPERACIÓN DE ANFIBIOS EN ESPAÑA

Aunque el número de programas de recuperación de especies amenazadas de anfibios ha aumentado en las últimas décadas (Silva *et al.* 2009; Harding *et al.* 2016), su impacto real dista de ser tangible. Por ejemplo, tan sólo el 8.9 % de los proyectos LIFE de Europa dirigidos a la protección de la flora y fauna, están orientados a los anfibios, de los cuales el 3.6 % corresponde a proyectos nacionales.

La traslocación como herramienta de recuperación de poblaciones amenazadas

La traslocación es una herramienta ampliamente utilizada en programas de recuperación de fauna silvestre. Inicialmente, tenía un objetivo cinegético, para el control de mascotas, o para evitar confrontaciones con la actividad humana (Carter *et al.* 2017). Sin embargo, con el paso del tiempo se transformó en una herramienta más en los programas de recuperación (Armstrong & Seddon 2008). Su aceptación social ha crecido a la par que sus posibilidades de financiación (Rummel *et al.* 2016), aunque ha desviado la atención de los factores que realmente están generando el declive (Carter *et al.* 2017), y cuya neutralización debería ser el principal objetivo (Pérez *et al.* 2012). Para aumentar el éxito de las traslocaciones, se debe tratar de predecir las tasas de supervivencias de los ejemplares traslocados, el éxito de su aclimatación al nuevo ambiente, qué estadio de desarrollo sea el óptimo en la liberación, o la distribución de los eventos de liberación (Helmstedt & Possingham 2017; O'Donnell *et al.* 2017).

La traslocación se ha propuesto como una herramienta de conservación cuando su fracaso sea aceptable y cuando haya habido una restauración previa del hábitat (Trenham & Marsh 2002). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la traslocación suele ser compleja y suele requerir una inversión de tiempo elevada (Carter *et al.* 2017). Se requiere un alto conocimiento ecológico de la especie, de su comportamiento, de los factores que han afectado al declive, y de las estrategias de mitigación aplicadas (Carter *et al.* 2017).

La restauración del hábitat y el éxito de la traslocación están íntimamente correlacionados (Sarrazin 2007), de ahí que en España, tres de los cinco proyectos LIFE obtenidos, están orientados a la restauración de medios degradados. En Valencia por ejemplo, la recuperación de las poblaciones de anfibios se orientó a la restauración de las charcas (LIFE05 NAT/E/000060), mientras que en Álava se crearon nuevas charcas para la protección de *Rana dalmantina*, Fitzinger 1838 (LIFE10 NAT/ES/000572). En el bosque de Orgi (Navarra), décadas después de la práctica desaparición de la población de *R. dalmantina*, cerca de 3,000 larvas fueron traslocadas, no sin antes restaurar el hábitat primordial de la especie y crear nuevos lugares de reproducción (Gosá 2003). Otro ejemplo lo encontramos en Mendizorrotz (Guipuzkoa), donde la población de *Hyla meridionalis*, Boettger 1874, fue reforzada con adultos y larvas tras una restauración previa del hábitat (Rubio & Etxezarreta 2003).

Programas de cría *ex situ* en España

El número de programas de cría en cautividad en el mundo ha aumentado casi un 56% en los últimos diez años (Harding *et al.* 2016). Más aún, se estima que el 3% de las especies de anfibios

están o han estado involucrados en programas de cría en cautividad (Harding *et al.* 2016). La disparidad de instituciones que mantienen una especie en cautividad, llevó en 2002 a la IUCN a redactar una guía de manejo de especies en cautividad, buscando así unificar criterios y metodologías (Griffiths 2017). Dicha guía se actualizó en el 2014 y en ella se redactaron cinco pasos que debían ayudar en el proceso de decisión de comenzar un programa de cría (IUCN/SSC 2014):

1. Evaluar el estatus de la especie amenazada y analizar las amenazas
2. Definir el objetivo del programa *ex situ*
3. Determinar las características del programa *ex situ*
4. Analizar los recursos económicos y humanos para el programa
5. Decidir sobre la viabilidad del proyecto

Si bien dentro de los programas de cría la investigación sigue siendo el principal objetivo (Harding *et al.* 2016), el rápido declive de las poblaciones de anfibios, especialmente motivado por las enfermedades emergentes (Stuart 2012), ha desempolvado el concepto desarrollado en los años noventa del “Arca de los anfibios”. Este término designa el desarrollo y ejecución de programas de cría *ex situ* a largo plazo para prevenir la extinción de las especies amenazadas (Bowkett 2009), normalmente en el rango de distribución de la especie cautiva (Harding *et al.* 2016).

En España, tres especies de anfibios se mantienen hasta la fecha en cautividad con fines conservacionistas: *Alytes muletensis* Sanchiz y Adrover 1979, *Alytes dickhilleni*, Arntzen y García-París 1995 y *Calotriton arnoldi*, Carranza y Amat 2005.

1. Alytes muletensis

El género *Alytes* es uno de los géneros de anfibios más amenazados de España. La degradación del hábitat, la introducción de especies amenazadas y *Bd* son responsables de numerosos declives (Bosch *et al.* 2001, 2006a; Pleguezuelos *et al.* 2002). Especialmente preocupante es la capacidad de dispersión de *Bd*, que, unido a las mortandades masivas asociadas a este hongo patógeno, han motivado el incremento de cría *ex situ* temporales de poblaciones por todo el mundo (Zippel *et al.* 2011).

El programa de recuperación del ferreret (*A. muletensis*), es un ejemplo (paradójico) de la dificultad de los programas de recuperación, y de la dificultad del control de los factores que propician el declive de una población. Esta especie actualmente está catalogada por la lista roja de especies amenazadas de la IUCN como Vulnerable, si bien en 1990 estaba catalogada como

Amenazada, y en 1996 como en Peligro Crítico. La principal amenaza identificada era la introducción de depredadores alóctonos, especialmente las culebras del género *Natrix spp.*, que depredaban sobre la especie (Román & Mayol 1997). Para proteger las escasas poblaciones se realizaron campañas sucesivas de erradicación de depredadores, se restauraron hábitats identificados como críticos para la especie, y se desarrolló con éxito el programa de cría en cautividad en el Zoo de Durrell, Inglaterra. Dicho programa de cría comenzó en los años 80, donde desde 1985 hasta 2002, se han criado 2,577 larvas y 1,847 adultos (Mayol & Oliver 2009; Oliver *et al.* 2009). Por desgracia, el programa de reintroducción de la especie conllevó la introducción de ejemplares infectados con *Bd* en el hábitat del ferreret (Walker *et al.* 2008), donde las primeras mortandades masivas de la especie comenzaron a registrarse. Debido a esto, en el 2002 se interrumpió el programa de reintroducción de la especie. Actualmente se ha conseguido eliminar *Bd* de masas de agua aislada, todo un hito para la conservación frente a esta enfermedad (Bosch *et al.* 2015).

II. *Alytes dickhilleni*

El sapo partero bético es una especie catalogada como Vulnerable por la IUCN, y se distribuye por el sudeste peninsular, siendo una de las especies endémicas de la península ibérica. Su declive se asoció a la excesiva extracción del agua de los acuíferos de la zona, la sequía prolongada y el abandono de abrevaderos y otras masas de aguas, usadas principalmente para el ganado (Pleguezuelos *et al.* 2002). Aunque no se han registrado mortandades masivas de la especie, *Bd* fue detectado en varias poblaciones (Bosch *et al.* 2013). Debido a la sensibilidad mostrada por la especie al hongo patógeno quitridio, comenzó, como prevención, el desarrollo del programa *ex situ* de la especie, llevado a cabo por el Zoo de Fuengirola en colaboración con el Zoo de Durrell. Adicionalmente, y para mejorar las poblaciones de *A. dickhilleni*, se crearon o restauraron masas de agua con el fin de aumentar los puntos de reproducción de la especie (Bosch & González-Miras 2012).

III. *Calotriton arnoldi*

El tritón del Montseny es un endemismo catalán catalogado como en Peligro Crítico de Extinción por la IUCN. Fue descrito por primera vez para la ciencia en 2005, e inmediatamente se incluyó dentro de la lista roja de especies amenazadas de IUCN, lo que conllevó el desarrollo de un programa de recuperación y la cría en cautividad de la especie. En diez años, 1,700 ejemplares han sido criados en cautividad entre el Zoo de Barcelona y el centro de cría en cautividad construido para la especie (Valbuena-Ureña *et al.* 2017). En el 2015, se concedió fondos LIFE europeos destinados a restaurar su hábitat mediante la administración de los ríos y las fuentes

de agua. Hasta el momento, esta especie no está amenazada por *Bd*, si bien, la aparición de una nueva especie de quitridio patógeno especialmente virulento en urodelos, *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel *et al.* 2013), podría tener consecuencias negativas para la especie.

Limitaciones de los programas *ex situ* de cría

Los anfibios, *a priori*, son especies que deberían ser fáciles de criar en cautividad porque normalmente carecen de cuidado parental, tienen una tasa de fecundidad alta y su tamaño es pequeño (Bloxam & Tonge 1995). A lo largo de las últimas décadas, se ha registrado un relativo éxito en los programas de cría en cautividad (Denton *et al.* 1997; Kinne 2004; Kinne *et al.* 2006), lo cual ha incrementado una sensación de euforia entre los conservacionistas. Acorde a los datos analizados por Harding *et al.* (2016), desde 1966 hasta 2006, el número de programas de cría *ex situ* de anfibios orientado a salvaguardar poblaciones amenazadas se ha incrementado notablemente, si bien el objetivo primordial sigue siendo la experimentación científica.

Sin embargo, estos programas han sido criticados debido a su bajo éxito, la ausencia de objetivos claros, el desconocimiento de los factores necesarios para la cría, y la selección genética artificial entre los ejemplares mantenidos en las colonias cautivas (Dodd & Seigel 1992; Griffiths & Pavajeau 2008; Williams & Hoffman 2009). Dichos hándicaps pueden incrementarse con las generaciones (Browne & Zippel 2007), lo cual debería limitar el empleo de esta práctica en conservación (Snyder *et al.* 1996). Además, debe considerarse el factor económico (*i.e.* inversión monetaria y de recursos humanos), que puede limitar el éxito del proyecto (Helmstedt & Possingham 2017). Estas consideraciones generan nuevas preguntas (Pérez *et al.* 2012) y debería requerir la revisión de los programas *ex situ* de cría: 1) ¿cuándo es viable mantener una colonia cautiva?; 2) ¿se puede mantener la colonia cautiva hasta que los factores detonantes de los declives estén controlados?. Semlitsch (2002) consideraba que los programas de cría en cautividad son necesarios cuando la tasa de supervivencia adulta es baja y las poblaciones son pequeñas, si bien el riesgo de un *fitness* bajo en los ejemplares producidos en cautividad es elevado (Willoughby *et al.* 2017). Quizá, como bien propusieron Canessa *et al.* (2016), el potencial real de la cría en cautividad radica en que provea a los programas de recuperación del tiempo necesario para evaluar e implementar las medidas de protección y restauración del medio que la especie cautiva habita.

SITUACIÓN DE LAS POBLACIONES DE ANFIBIOS DEL MACIZO DE PEÑALARA HASTA 2008

El Macizo de Peñalara es un área protegida con una extensión de 768 hectáreas, que se haya entre 1,800-2,430 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), y que está incluido en el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Madrid (figura 2). Su origen se remonta a su promulgación el 30 de septiembre de 1930, junto a La Pedriza y el Encinar de la Acebeda, como Sitio Natural de Interés Nacional, conformando en su totalidad el denominado Sitio Natural de La Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara. En 1975, con la aprobación de la Ley de Espacios Protegidos, se creó la figura de Parque Natural, en la que quedó definitivamente, en 1990, integrado el Macizo de Peñalara. A finales de la década de los 60, y tras la presión social derivada de la práctica de los deportes de invierno, se amplía la oferta de estaciones de esquí, en la que la estación de Navacerrada era la única en la sierra madrileña, con las estaciones de Valdesquí y Valcotos (localizada ésta última en el Macizo de Peñalara). Valcotos mantuvo su funcionamiento desde 1968 hasta 1998, cuando la totalidad de la zona fue expropiada por la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad Autónoma de Madrid, dando lugar al desmantelamiento de las infraestructuras y la restauración geomorfológica y de la cubierta vegetal (De Pedraza Gilsanz 2002; Sánchez-Herrera Herencia 2002). Para retirar los elementos más pesados, minimizando los posibles daños causados en el desmantelamiento, se emplearon medios aéreos; mientras que para retirar los elementos más pequeños se utilizaron mulas (Sánchez-Herrera Herencia 2002).

El Macizo de Peñalara se caracteriza por contener más de 250 masas de aguas, incluidas dentro de la Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas, entre lagunas, arroyos, charcas y turberas. Esto ha propiciado que 15 especies de anfibios habiten el macizo y sus alrededores, de las cuales cinco son endemismos ibéricos. Entre éstas especies, destacan el sapo partero común (*Alytes obstetricans*), Laurenti 1768, la rana patilarga (*Rana iberica*), Boulenger 1879, la salamandra común (*Salamandra salamandra*), Linneo 1758, el sapo común (*Bufo spinosus*), Daudin 1803, el sapo corredor (*Epidalea calamita*), Laurenti 1768, el tritón jaspeado (*Triturus marmoratus*), Latreille 1800, el tritón alpino (*Ichthyosaura alpestris*), Laurenti 1768, la rana común (*Pelophylax perezi*), López Seoane 1885, la rana de San Antonio (*Hyla molleri*), Bedriaga 1889 y el sapillo pintojo ibérico (*Discoglossus galganoi*), Capula, Nascetti, Lanza, Bullini y Crespo 1985.

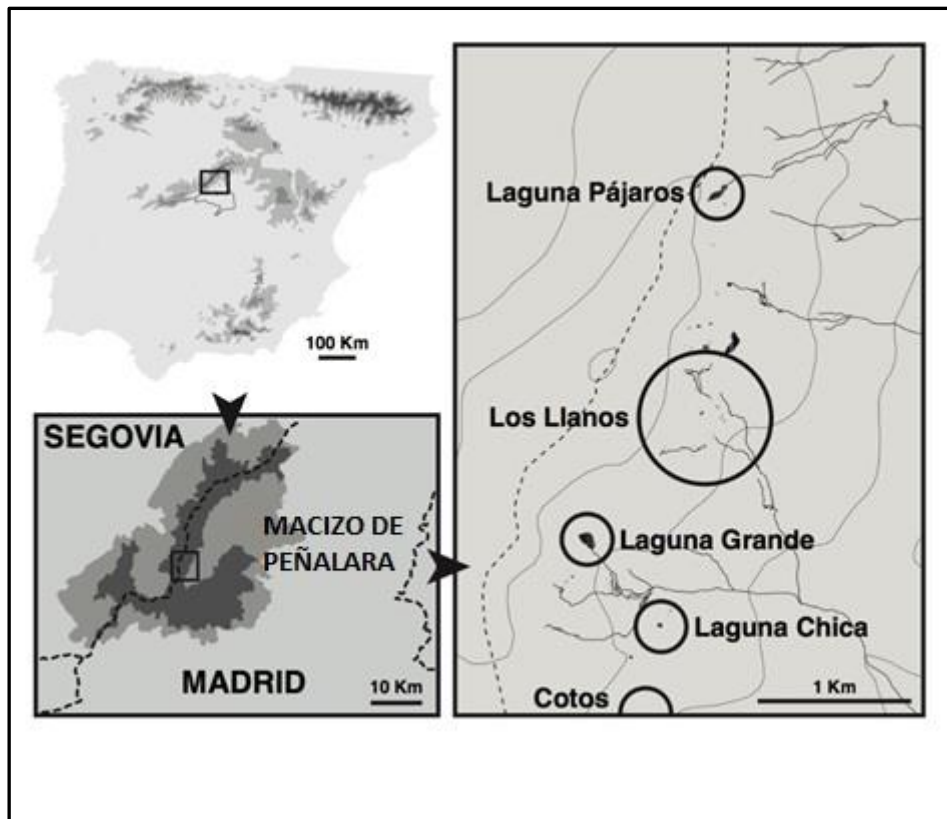


Figura 2: Mapa del Macizo de Peñalara y sus principales lagunas y charcas.

Sapo partero común

Alytes obstetricans es un sapo de pequeño tamaño (40 a 50 mm) ampliamente distribuido en Europa, y en España (figura 3), donde existen poblaciones desde el nivel del mar hasta zonas de alta montaña (Pleguezuelos *et al.* 2002). Esta especie se ha catalogado como Casi Amenazada por la IUCN y los modelos sobre el impacto del cambio climático estiman una disminución del 88% de su distribución en el futuro (Araújo *et al.* 2011). Las larvas alcanzan tamaños de entre 40-90mm y suelen tener un desarrollo larvario prolongado (que puede durar varios años en regiones montañosas). Los ejemplares adultos son predominantemente nocturnos, encontrándose de día bajo rocas donde excavan pequeñas galerías. Se alimentan principalmente de invertebrados y su periodo reproductivo se extiende en el Macizo de Peñalara desde mayo a septiembre aproximadamente.



Figura 3. Mapa de distribución en amarillo de *A. obstetricans* en Europa (Fuente: web de IUCN, 17/01/2017).

La especie carece de dimorfismo sexual aparente, si bien se han detectado diferencias sexuales empleando datos morfométricos (Bosch & Márquez 1996). El rasgo más significativo del género *Alytes* es que los machos acarrean hasta la eclosión de los huevos, una o varias puestas entrelazadas en sus patas traseras (figura 4), por lo que las hembras compiten entre sí por los machos (Verrell & Brown 1993).



Figura 4: Macho de *A. obstetricans* acarreando una puesta (J. Bosch©).

La liberación de la puesta se realiza en masas de agua generalmente permanentes, donde la larva continuará su desarrollo hasta la metamorfosis.

Rana patilarga

Rana iberica (figura 5) es una rana parda de pequeño tamaño (34-42mm) catalogada como Vulnerable en el Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles Amenazados de España (Pleguezuelos *et al.* 2002) y como Casi Amenazada por la IUCN. Los modelos del efecto del cambio climático estiman una constricción de su distribución peninsular, sugiriendo medidas *in situ* a medio plazo para su conservación (Araújo *et al.* 2011).



Figura 5: Adulto de rana patilarga (J. Bosch ©).

Se encuentra distribuida principalmente por el noroeste peninsular, con poblaciones dispersas en las montañas cántabras y en el Sistema Central. A lo largo de su distribución aparece en zonas bajas o medias (hasta 900 m.s.n.m.), como ocurre en Portugal, Galicia y Asturias. En el Sistema Central, por el contrario, habita zonas de alta montaña (hasta 2,200 m.s.n.m.) en la Sierra de Gredos y la Sierra de Guadarrama (figura 6). Son animales de hábitos nocturnos, aunque pueden encontrarse de día ocultos entre la vegetación o sobre piedras en los márgenes de arroyos y riachuelos. Los juveniles tienen una actividad más diurna que los adultos, si bien en los meses de verano, es mayor por la noche ya que la temperatura así lo permite.



Figura 6: Distribución en amarillo de *R. iberica* en la península ibérica (Fuente: web de IUCN, 17/01/2017).

Además, en el centro peninsular, son de costumbres más terrestres que los adultos, observándose una mayor tendencia terrestre en otoño. En el Macizo de Peñalara las puestas pueden encontrarse a partir de mayo, localizadas en arroyos de aguas rápidas. Las larvas pueden observarse durante los meses de junio a septiembre, permaneciendo algunas larvas como invernantes. Bosch *et. al* (2006b) describieron la preferencia de las larvas de rana patilarga del Macizo de Peñalara por aguas de poca corriente (probablemente para no ser arrastradas agua abajo), intercaladas con pozas y evitando aguas estancadas con abundante vegetación o zonas de cascadas y rápidos.

Declive del sapo partero común y la rana patilarga en el Macizo de Peñalara

A lo largo de las últimas décadas, se ha registrado un descenso alarmante de la población de sapo partero común y de rana patilarga (figura 7) asociados a *Bd* y a la introducción en la cabecera de los arroyos del Macizo de dos especies ictícolas: el salvelino (*Salvelinus fontinalis*), Mitchell 1814, y la trucha común (*Salmo trutta*), Linneo 1758 (Bosch *et al.* 2001, 2006b; Bosch & Martínez-Solano 2006).

I. Declive asociado a Bd

Las primeras mortandades masivas de *A. obstetricans* asociadas a *Bd* en el Macizo de Peñalara se registraron en 1997, y en un periodo de tres años desapareció del 86% de las charcas que habitaba (Bosch *et al.* 2001). Principalmente se hallaron ejemplares post-metamórficos muertos, lo que indicaba la gran susceptibilidad de la especie a la enfermedad tras la metamorfosis. La alta mortandad, unida al bajo número de huevos por puestas y los largos periodos larvarios (lo que aumenta sus probabilidades de entrar en contacto con las zoosporas de *Bd*), hicieron que su declive fuese rápido. La modelización del efecto del quitridio sobre una población dada, sugiere que ésta podría persistir si existen ejemplares que permanezcan sin infectar (Briggs *et al.* 2005). Así, podría generarse una selección natural hacia individuos resistentes frente a *Bd*, pudiendo usarse dichos animales en programas de cría en cautividad (Young *et al.* 2007; Woodhams *et al.* 2011; Knapp *et al.* 2016).

En el caso de la rana patilarga, no se han observado mortandades masivas en el Macizo de Peñalara ni se han capturado ejemplares infectados en el campo, si bien se ha comprobado en laboratorio que las larvas pueden infectarse (Fernández-Beaskoetxea *et al.* 2016).

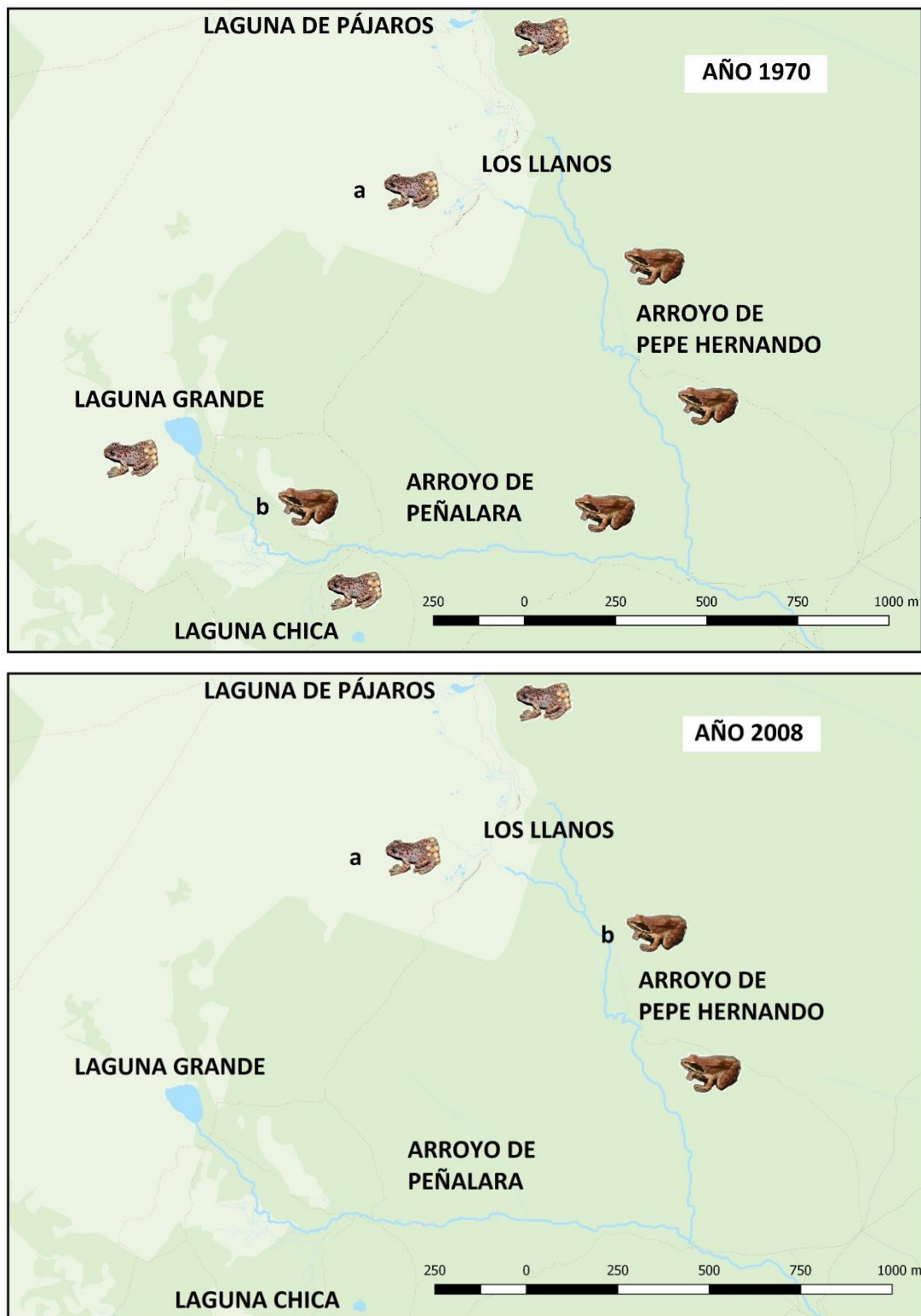


Figura 7: Distribución de *A. obstetricans* (a) y *R. iberica* (b) antes (1970) y después (2008) de las introducciones del salvelino y la aparición de la quitridiomycosis en el Macizo de Peñalara.

II. Declive asociado a la introducción del salvelino y la trucha común

En los años 70 se produjeron las primeras introducciones deliberadas del salvelino para la pesca deportiva en los arroyos y lagunas del Macizo de Peñalara (Bosch *et al.* 2006b). Simultáneamente, la trucha fue traslocada desde las zonas bajas de los arroyos (donde una barrera natural, *e.g.* una cascada de grandes dimensiones), probablemente impidiera la colonización natural de las regiones altas del arroyo a la cabecera de éstos (Bosch *et al.* 2006b). El impacto de dichas introducciones en la fauna del Macizo fue estudiado por Granados *et al.* (2006), quienes demostraron que alteró la estructura de invertebrados de la Laguna Grande, aumentando la densidad de los invertebrados de pequeño tamaño, así como supuso la desaparición de este enclave como punto de reproducción para la salamandra común y el sapo partero común. Así mismo, propició la desaparición de la rana patilarga en la Hoya de Peñalara y su práctica desaparición en la Hoya de Pepe Hernando (figura 7 y figura 8) (Bosch *et al.* 2006b). Korsu *et al.* (2009) comprobaron que cuando el salvelino y la trucha comparten el mismo hábitat, se produce una segregación espacial, encontrándose principalmente al salvelino en pozas y a las truchas en los rápidos. Las larvas de *R. iberica*, cuyo desarrollo se produce principalmente en pozas, eran incapaces de detectar al salvelino como depredador potencial, lo que probablemente ocasionó su desaparición de la Hoya de Peñalara (Bosch *et al.* 2006b).

MEDIDAS DE PROTECCIÓN REALIZADAS EN EL MACIZO DE PEÑALARA HASTA 2008

Desde la constatación del declive de ambas especies, se ha procedido en el Macizo a realizar un seguimiento anual de las poblaciones, y se han ejecutado ciertas medidas orientadas a su conservación.

Declaración de zonas de máxima protección de anfibios y creación de puntos de reproducción

La popularidad del Macizo de Peñalara entre la sociedad supuso un reto considerable, más cuando soporta cerca de 100,000 visitantes anuales. Así, se crearon áreas de especial protección para los anfibios, que fueron valladas para evitar el pastoreo en las orillas y las molestias de los visitantes. En dichas zonas se crearon refugios para los anfibios. En Cotos, el parking para vehículos fue dividido en dos secciones, permitiendo el paso del arroyo de Cotos entre ambos, el cual además fue represado en dos tramos (Bosch 2005). Estas zonas represadas se

convirtieron rápidamente en un lugar de reproducción de *A. obstetricans*. Además, se construyeron nuevos refugios y puntos de reproducción.

Pesca eléctrica

En 1999 comenzó la captura pasiva mediante redes del salvelino y la trucha común en la Laguna Grande. Tras cuatro años, y capturar 557 ejemplares, este enclave quedó libre de peces. La Laguna Grande ha sido considerada el punto del que partió la colonización aguas abajo por parte del salvelino, de los arroyos de Peñalara y Dos Hermanas (Granados *et al.* 2006) (figura 8).

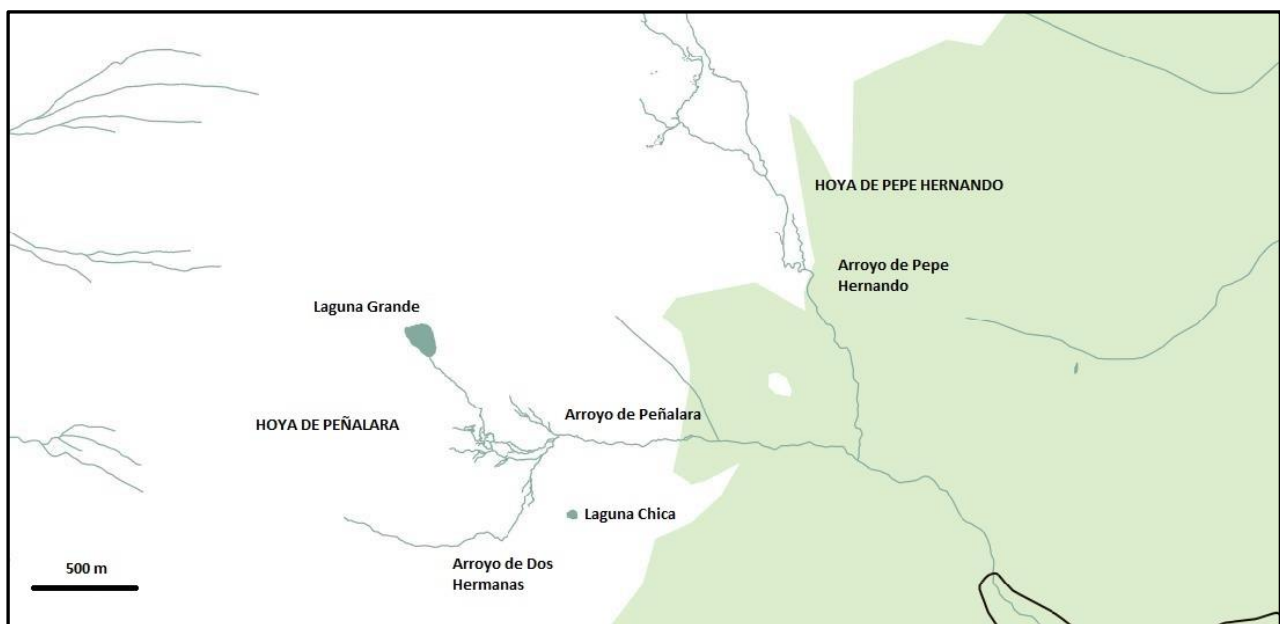


Figura 8: Mapa de la Hoya de Peñalara y de la Hoya de Pepe Hernando y sus arroyos principales.

En 2002 comenzaron las campañas de erradicación mediante la pesca eléctrica de los salmónidos en el arroyo de Pepe Hernando. La principal dificultad, además del terreno, era la posibilidad de los salvelinos de compensar la extirpación de los ejemplares aumentando su tasa de crecimiento, reclutamiento o aumentando la fecundidad (Jensen 1971; Donald & Alger 1989).

Los salvelinos capturados fueron eliminados y las truchas comunes, tras ser marcadas cortándoles la aleta adiposa, fueron liberadas tras la cascada que actuaría como barrera natural. El fin de dicho marcaje era comprobar si las truchas eran capaces de sobrepasar dicha barrera y

si las suposiciones de que ésta hacía de límite superior natural eran correctas (Bosch *et al.* 2006b). Hasta el 2008 no se ha encontrado ninguna trucha marcada.

La pesca eléctrica en el arroyo de Peñalara comenzó en 2003, y se centró exclusivamente en el salvelino, ya que se desconocía si la trucha común fue introducida o era autóctona de esta zona. Desde el comienzo de la biomanipulación de la población del salvelino, el número de ejemplares capturados fue disminuyendo paulatinamente, hasta que en el 2005, se consideró que la población de salvelino del Arroyo de Dos Hermanas estaba al borde del colapso. A comienzos del 2008, el salvelino seguía presente en el arroyo de Peñalara y quedaban poco ejemplares en el Arroyo de Dos Hermanas.

Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama

El objetivo del Centro es mantener en cautividad aquellos anfibios de la Sierra de Guadarrama que se hallen en peligro. Se encuentra en las instalaciones del Puente del Perdón, localizadas en Rascafría, Madrid, a 15 km del Macizo de Peñalara.

Para las instalaciones se utilizó una construcción preexistente diáfana que fue tabicada para formar 5 espacios diferenciados. Cada sala tiene su propia instalación eléctrica para poder mantener diferentes condiciones ambientales según las necesidades del momento. En caso de interrupción del suministro eléctrico, la energía es suministrada por un generador de gasolina externo, con autonomía para varias horas. El Centro es abastecido con agua procedente de un manantial cercano llamado El Aguilón. Estas aguas se filtran antes de llegar al Centro de Cría, y una vez que han recorrido sus instalaciones, se tratan con cloro en un tanque exterior en el que se acumulan. De allí se vierten a un pozo ciego.

Las instalaciones del Centro constan de cinco salas aisladas: Entrada, Sala de preparación del alimento, Sala de alimento vivo, Sala de larvas y Sala de adultos. Los suelos de cada habitación se pintaron con pintura plástica, lo que facilita el mantenimiento y limpieza de estos, dado el empleo diario de agua:

1. Entrada: sirve para la recepción de visitantes y contiene paneles informativos sobre la problemática de los anfibios del Parque y las diferentes especies presentes. Se emplea como zona de trabajo, lectura y registro informático de los datos obtenidos.
2. Sala de preparación del alimento: en ella se almacenan y preparan los diferentes ingredientes empleados en la alimentación de la colonia permanente de grillos, así como el preparado de larvas. Además cuenta con una nevera y un arcón donde se guardan muestras para analizar en el laboratorio, medicinas y alimento perecedero.

3. Sala de Alimento Vivo: se mantiene una colonia de grillo común (*Acheta domesticus*), Linneo 1758, empleada como alimento vivo para los ejemplares metamorfoseados del Centro. Esta sala se encuentra a una temperatura de 30 °C gracias a un calefactor con termostato y cuenta con 8 cubetas de plástico de grandes dimensiones (figura 9). Cada cubeta contiene grillos de un estadio de desarrollo diferente, lo que facilita la adecuación de la presa al tamaño del anfibio a alimentar y evita el canibalismo de los adultos sobre las ninfas. Todas las cubetas están dotadas de una bombilla reflectora de 60 vatios (en ciclo de luz/oscuridad de 12h:12h) y 12 hueveras de cartón, que aumentan el espacio disponible y crea zonas de sombras. Los grillos son alimentados con naranjas, lechuga fresca, comida específica de grillos y comida de perros humedecida. Como aporte de agua se facilita hidrogel, un compuesto que al contacto con el agua aumenta su tamaño y puede así ser ingerido por los insectos sin ahogarse.

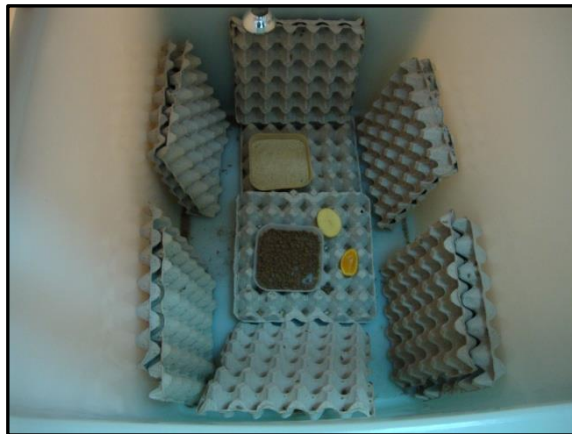


Figura 9: Cubeta para la cría de grillos de la Sala de Alimento Vivo del Centro de Cría.

4. Sala de larvas: consta de 38 acuarios de 80 litros cada uno dispuestos en dos filas. Cada acuario consta de su propio sistema de entrada de agua y desagüe, aunque todos vierten a un tubo colector común. Para regular el flujo de agua a los acuarios, la sala posee un grifo común del que parten las ramificaciones a cada acuario y cada acuario posee su propio grifo. Los acuarios tienen una lámpara de radiación UV A y B a 20 cm del agua, que está conectada a un programador en un ciclo de luz/oscuridad de 12h:12h. Como refugios se facilitan dos cuencos de barro y como sustrato una capa de 5 mm de grava de 1 mm de diámetro (figura 10). La sala cuenta además con un sistema de aire acondicionado que mantiene una temperatura constante aproximada de 18 °C y un extractor de humedad. La eliminación de las heces de larvas se realiza mediante un limpiador de fondo para acuarios.

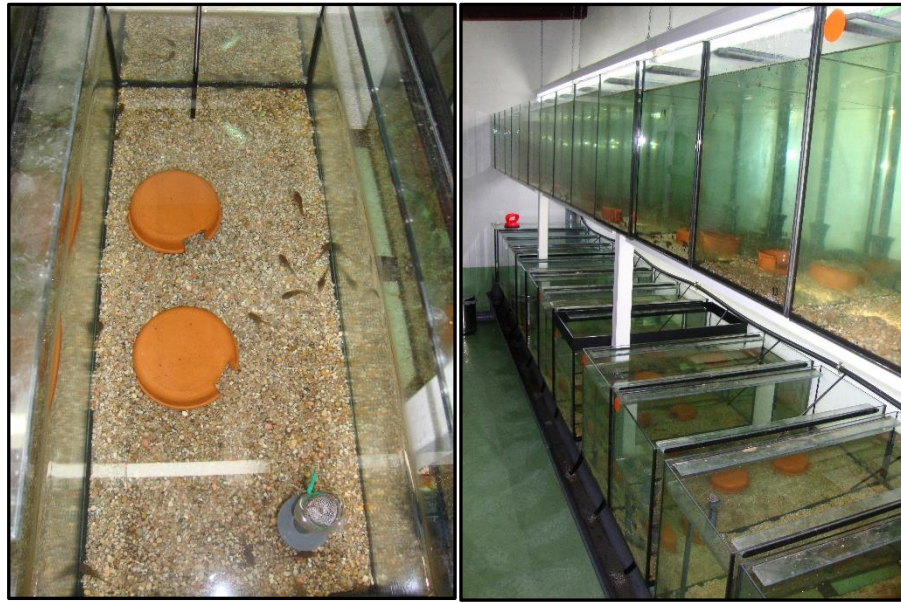


Figura 10: Vista de la Sala de Larvas y un acuario del Centro de Cría.

5. Sala de adultos: En esta sala se mantienen a juveniles, recién metamorfoseados y adultos. Posee un sistema de aire acondicionado que mantiene la temperatura a 23 °C para inhibir el crecimiento de *Bd*. La sala cuenta con cuatro tipos de cajas de PVC:

- Cajas denominadas “colectivas” de 31 x 27 x 36 cm (alto x ancho x largo).
- Cajas denominadas “individuales” de 30 x 12 x 47 cm
- Cajas denominadas “de tratamientos” de 12 x 16 x 46 cm
- Cajas denominadas “de adultos” de 31,5 x 34,5 x 54 cm

Las cajas se componen de una capa basal de grava de 10 mm de diámetro. Por encima hay un refugio de arcilla y una pequeña piscina para que el anfibio pueda refrescarse. Las cajas de adultos difieren en que por encima de la capa basal de grava, hay dispuesta una tela y sobre ésta, una capa de 15 cm de tierra higienizada. Adicionalmente se disponen refugios de arcilla, rocas, trozos de tierra y piscinas.

Tanto las cajas individuales como colectivas están dotadas de un sistema de riego temporizado, por lo que, además de la piscina, son humedecidas con agua dos veces al día (figura 11). Además ambas cajas tienen lámparas UV A y B a menos de 20 cm de ellas como fuente de luz natural. Dichas lámparas, al igual que en la Sala de Larvas, regulan el fotoperiodo. En este caso, el fotoperiodo se ajusta a la media del ciclo de luz/oscuridad mensual del Macizo de Peñalara, por lo que mensualmente se cambia.



Figura 11: Caja colectiva por dentro, con el refugio, la piscina y el sistema de riego de la Sala de Adultos del Centro de Cría.

Además, en esta sala se mantienen las colonias de mosca *Drosophila melanogaster*, Meigen 1830, empleadas para alimentar a los ejemplares que completan la metamorfosis con un tamaño reducido. Esta sala también cuenta con una pila de agua y un calentador que se emplea para la limpieza en profundidad de las cajas.

ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN LA CRÍA EN CAUTIVIDAD

Se denomina enriquecimiento ambiental a la técnica que busca aumentar el bienestar físico y mental de una colonia anfibia cautiva mediante los estímulos ambientales necesarios (Shepherdson 2012), lo que en última instancia reduciría el estrés de los ejemplares cautivos y, por tanto, aumentaría el *fitness* de la colonia (Williams & Hoffman 2009). Las técnicas de enriquecimiento ambiental pueden enfocarse tanto en el periodo larvario, como en el post-metamórfico, y han sido objeto de interés desde principios del siglo XX (Shepherdson 2012). La investigación se ha centrado principalmente en identificar, caracterizar y evaluar la importancia de los estímulos ambientales, buscando las formas más efectivas de implementarlos (Shepherdson 2012). Así, tener un conocimiento amplio de la especie cautiva sobre su comportamiento y su ecología, se torna esencial. ¿Qué factores pueden medir el *fitness* en los anfibios? La supervivencia es, sin duda, el factor más estudiado (Allentoft & O'Brien 2010). El crecimiento, especialmente el crecimiento larvario y la tasa de desarrollo larvario, son otros

buenos indicadores; así como las anomalías físicas, el consumo de oxígeno o el tamaño de la puesta y el éxito de la reproducción (Allentoft & O'Brien 2010).

Enriquecimiento ambiental larvario

El crecimiento larvario en anfibios, según propusieron Wilbur & Collins (1973), se ajusta a una curva de crecimiento sigmoidea y se haya condicionado por un conjunto de factores que interactúan acelerando el desarrollo larvario o decelerándolo. Si el crecimiento de una larva se decelera, se aumenta el tamaño específico en cada estadio (Smith-Gill & Berven 1979), obteniéndose, normalmente, larvas de mayor tamaño. Por el contrario, si el crecimiento larvario se acelera, el tamaño larvario específico de cada estadio es menor, obteniéndose usualmente ejemplares más pequeños tras la metamorfosis.

Entre los factores más importantes que afectan al desarrollo se encuentran la temperatura, la densidad de ejemplares, la alimentación o la radiación ultravioleta. Dichos factores pueden actuar sinérgicamente, y han sido bien estudiados por la ciencia.

Probablemente el agente que más influencia tenga sobre el tamaño y tiempo de desarrollo larvario sea la temperatura (Newman 1998; Álvarez & Nicieza 2002; Loman 2002). Las bajas temperaturas suelen retrasar la diferenciación larvaria más que el crecimiento larvario, incrementando de ese modo el tamaño específico en cada estadio (Smith-Gill & Berven 1979). Así se obtienen tamaños de metamorfosis mayores (Álvarez & Nicieza 2002), quizá debido a una disminución en la demanda metabólica bajo estas condiciones (Newman 1998). Carey *et al.* (2005) comprobaron que a baja altitud, el agua estaba más caliente y las larvas de *Anaxyrus boreas*, Baird y Girard 1852, se desarrollaban antes que a altitudes más elevadas. Más aún, los mismos autores constataron que en los veranos calurosos, los recién metamorfoseados eran más pequeños que en los años en los que el verano era más suave. Kendell (2002) comprobó que la temperatura afectaba al comportamiento, al crecimiento, al desarrollo y a la tasa de metamorfosis de *Lithobates pipiens*, Schreber 1782.

La densidad es un factor muy correlacionado con la competencia e indirectamente lo está también con el hidroperiodo. A densidades altas, la competencia intra e interespecífica es elevada, lo que puede inducir una rápida metamorfosis (Loman 2002). El mismo efecto ha sido observado con el hidroperiodo (Székely *et al.* 2017). En las larvas de anfibios, la disminución del volumen de agua de una masa de agua genera densidades altas y aumento de la competencia, lo que podría ser el detonante de una metamorfosis más rápida. Wilbur & Collins (1973) demostraron una relación inversa entre el tamaño corporal y la densidad en *Lithobates*

sylvaticus, LeCont 1825. En poblaciones con una baja densidad larvaria se producía un incremento rápido del peso, mientras que a densidades medias, la ganancia era mucho menor. Newman (1998) observó en larvas de *Scaphiopus couchii*, Baird 1854, que a elevadas densidades la metamorfosis se producía más tarde pero con tallas menores. Las razones que motivan dichas respuestas no están claras.

Otro elemento que influye en el crecimiento y desarrollo de las larvas de anfibios es la alimentación (Loman 2002). El tiempo y el tamaño de la metamorfosis no responden de igual manera a una variación en la cantidad de comida (Newman 1998). Un periodo de carestía en estadios tempranos del desarrollo retarda la metamorfosis, mientras que en estadios más desarrollados lo acelera (Wilbur & Collins 1973). Según Newman (1998) la cantidad de comida limita el desarrollo pero el tamaño final de metamorfosis depende del conjunto de recursos que tenga la larva durante todo el periodo larvario. El propio autor comprobó que cuando sometía a larvas de *S. couchii* criadas en alta densidad a una variación de la cantidad de comida (de baja a alta), el efecto en el tiempo de desarrollo dependía de la temperatura (bajas temperaturas propiciaban un desarrollo larvario más lento).

Enriquecimiento ambiental juvenil

Existen numerosos estudios que demuestran las ventajas del mayor tamaño en ejemplares juveniles y adultos de anfibios: escapan mejor de los depredadores, pierden menor cantidad de agua por volumen de masa, maduran antes o atraen más parejas en la reproducción (Newman & Dunham 1994; Gray & Smith 2005; Harper & Semlitsch 2007).

Uno de los factores que afecta al crecimiento de los anfibios es la densidad. A mayor densidad, mayor competencia, menores tasas de supervivencia y menor tasa de crecimiento (Harper & Semlitsch 2007). Gray & Smith (2005) sugirieron que en dos hábitats diferentes (uno alterado por el hombre y el otro no), la diferencia de tamaños observados en los juveniles de *Spea multiplicata* y *Spea bombifrons*, Cope 1863, *Anaxyrus cognatus*, Say in James 1823, y *Ambystoma tigrinum mavortium*, Gray 1853, se debía principalmente al tipo de hábitat y la densidad de los juveniles en cada uno de ellos. Arendt (1997) proponía la existencia de una tasa de crecimiento intrínseca dependiente, para algunas especies, de la altitud. Así, poblaciones que se encontraban a elevadas altitudes tenían una tasa de crecimiento mayor, ya que el periodo favorable era breve y, por tanto, debían crecer rápido. Harper & Semlitsch (2007) sugirieron que aunque la mortandad en *L. sylvaticus* y *A. americanus* disminuyera la densidad poblacional a lo largo del tiempo, no existía un aumento en la tasa de crecimiento que compensase el efecto negativo inicial de la densidad.

Otro factor que afecta al crecimiento de los juveniles, al igual que en larvas, es la temperatura. Carey *et al.* (2005) comprobaron que para poblaciones de *A. boreas* de alta montaña, la temperatura es el principal factor que afecta al crecimiento de recién metamórficos, apuntando que quizá los días calurosos del verano son más importantes que las noches de la misma estación. Carey (1978) en la misma línea, sugirió que una elevada temperatura corporal podría influir en el crecimiento de *A. boreas* al mejorar la digestión del alimento. Según el modelo de crecimiento en ectotermos propuesto por Sibly & Atkinson (1994), la temperatura podría afectar a la mortandad juvenil y adulta.

La humedad ambiente ha sido propuesta como otro factor que puede afectar al tamaño de los juveniles, al aumentar la actividad de los ejemplares debido a la disminución del riesgo de deshidratación. Por ello es lógico suponer que aumentaría consecuentemente el crecimiento en juveniles y adultos. Sin embargo, Bellis (1962) observó una disminución de la actividad nocturna de *L. sylvaticus* asociada a bajas temperaturas. Más aún, el propio autor sugirió que los individuos de esta especie que viven en zonas secas tienen tamaños corporales mayores porque así disminuye la pérdida de agua corporal por evaporación.

La presencia de refugios parece influir positivamente en el crecimiento de los juveniles de *Engystomops pustulosus*, Cope 1864, *Leptodactylus fuscus*, Schneider 1799, y *Mannophryne trinitatis*, Garman 1888 (Patrick & Downie 2005). Estos autores observaron una tasa de crecimiento mayor si los ejemplares disponían de refugios, tanto por los beneficios en la osmorregulación (los refugios suelen tener una humedad alta y constante) como los beneficios frente a depredadores.

Enriquecimiento ambiental en adultos

Las bondades del empleo de la cría en cautividad en programas de recuperación son evidentes. Sin embargo, el mantenimiento y el éxito de estos programas están en entredicho, ya que hacen frente a numerosas dificultades, como se comentó previamente. Así, la correcta planificación de la colonia cautiva es esencial para la viabilidad del proyecto.

Uno de los puntos más importantes es el mantenimiento de la diversidad genética, la cual tiende a decrecer a medida que aumenta el número de generaciones que la especie permanece cautiva (Williams & Hoffman 2009; Willoughby *et al.* 2017). Esta pérdida se encuentra estrechamente relacionada con la reducción del *fitness* y el aumento de la deriva genética (Willoughby *et al.* 2017), lo cual puede limitar la viabilidad de los ejemplares producidos y, por tanto, comprometer el éxito de la reintroducción. Kraaijeveld-Smit *et al.* (2006) por ejemplo, demostraron que tras

9-12 generaciones en cautividad, los mecanismos antidepredatorios de *A. muletensis* se desarrollaban más lentamente que en condiciones normales. Así, se han sugerido un conjunto de estrategias para reducir la pérdida de variabilidad (Williams & Hoffman 2009):

1. Minimizar las generaciones cautivas a través de:
 - a. Técnicas de criopreservación del material genético (espermatozoides y óvulos): son muy laboriosas y requieren de materiales de precisión.
 - b. Retraso de la reproducción, separando la colonia cautiva por sexos. Ha sido recomendado para especies con vida larga y alta fecundidad (Swanson 2006). Se busca con ello obtener menos descendencia y, por consiguiente, disminuir el número de generaciones en cautiverio.
2. Minimizar la selección artificial mediante:
 - a. Estrategias de reproducción, haciendo que todos los grupos estén igualmente representados (Frankham 2008), lo que disminuye la diferencia en la reproducción entre grupos (Williams & Hoffman 2009) y mantiene la diversidad genética.
 - b. Recreación de ambientes similares a los naturales (Frankham 2008), que estimulen comportamientos más naturales en la población cautiva. Este método en sentido estricto, no tiene un efecto directo sobre la variabilidad genética de una población, pero se incluye porque indirectamente podría incidir sobre la falsa selección natural, producto de la ausencia de depredadores y parásitos, y la abundancia de recursos (Williams & Hoffman 2009).
3. Fragmentar la población cautiva en grupos más pequeños, reuniéndolos poco antes de su liberación; así como capturar ejemplares que son incluidos en la población cautiva, siempre y cuando el tamaño de la población salvaje lo permita (Williams & Hoffman 2009).

Para producir cohortes de una colonia cautiva se deben conocer los requerimientos fisiológicos y ecológicos de la especie con el fin de poder incitar el comportamiento sexual (Mendelson III & Altig 2015). Por un lado, se sabe que en el género *Alytes*, son las hembras quienes compiten por los machos disponibles para la reproducción (Verrell & Brown 1993), ya que los machos, una vez que acarrearán una puesta, pueden no volver a aparearse hasta la liberación de la puesta en una masa de agua (Lea *et al.* 2001). Por otro lado, especies cuyo ciclo vital incluye periodos de hibernación (*e.g.* reproducción discontinua), suelen requerir de ésta para el desarrollo de las gónadas (Paniagua *et al.* 1990; Kouba *et al.* 2009).

Diferenciación sexual en la colonia cautiva

Conocer el sexo de los ejemplares que conforman la población cautiva es importante. A diferencia de los machos de numerosas especies de anfibios, que en la época de reproducción desarrollan caracteres sexuales secundarios (*e.g.* sacos bocales, callosidades nupciales o crestas dorsales), el género *Alytes* carece de éstos. Por tanto, la diferenciación sexual es posible en época reproductiva, bien cuando el macho acarrea los huevos enrollados en sus patas traseras, o bien cuando, a través de la región abdominal de la hembra, pueden observarse las gónadas desarrolladas. A lo largo de los años, se han propuesto diferentes métodos de discriminación sexual, diferenciados entre invasivos y no invasivos:

- 1) De entre los métodos invasivos, cabe resaltar la incisión abdominal (Reyer & Battig 2004), que consiste en la incisión de 2mm de longitud en la región abdominal para distinguir la presencia de gónadas desarrolladas. Si bien esta técnica está citada como método de identificación de la madurez sexual de las hembras, podría extrapolarse a la propia identificación sexual.
- 2) Entre los métodos no-invasivos existe una gran variedad de técnicas desarrolladas:
 - a. Análisis de los niveles hormonales en orina y heces (Germano & Bishop 2009; Hogan *et al.* 2013).
 - b. Análisis con ultrasonidos (Reyer & Battig 2004; Graham *et al.* 2016).
 - c. Mediciones corporales con las que diferenciar por sexos (Bosch & Márquez 1996; Pinya & Pérez-Mellado 2009).

En 1996, Bosch & Márquez realizaron quince mediciones corporales diferentes en veinte machos y veinte hembras de la población de sapo partero común del Macizo de Peñalara, con el fin de desarrollar una función discriminante que permitiese identificar el sexo de un ejemplar. La función discriminante obtenida permitía agrupar correctamente a los ejemplares en el 95% de los casos (Bosch & Márquez 1996). Aunque esta técnica se empleó con éxito en otra población cautiva del género *Alytes* (Pinya & Pérez-Mellado 2009), dado que los ejemplares criados en cautividad pueden tener un tamaño corporal menor que ejemplares no cautivos (Adama *et al.* 2004), la función discriminante desarrollada por Bosch & Márquez en 1996 no puede aplicarse a la colonia cautiva del Centro de Cría en Cautividad.

Hibernación

Los factores que afectan a la reproducción sexual pueden dividirse entre aquellos que aseguran la reproducción en un periodo corto de tiempo (*e.g.* la disponibilidad de alimento), y aquellos

factores ambientales que inducen la reproducción (Paniagua *et al.* 1990). Entre estos últimos se encuentran el fotoperiodo, la temperatura o la pluviosidad (Paniagua *et al.* 1990). Quizá el más importante de ellos, al ser especies poiquilothermas, sea la temperatura (Rastogi *et al.* 2011). En términos generales, la gametogénesis tiene, independientemente de la latitud en la que la especie se halle, un rango de temperatura máximo y mínimo, y una temperatura óptima (Rastogi *et al.* 2011). Entre los programas de cría en cautividad, surge la cuestión primordial de si, para estimular correctamente la reproducción en poblaciones de alta montaña, es necesario que los ejemplares se sometan a un periodo de hibernación. Por un lado, se ha observado que el empleo de hormonas exógenas suele tener un efecto positivo en la ovulación cuando se combina con un descenso moderado de la temperatura (Kouba *et al.* 2009). Se sabe además, que las bajas temperaturas suele reducir la actividad gonadal, mientras que un aumento de la temperatura (como ocurre en primavera en regiones templadas) suele estimular la gametogénesis (Paniagua *et al.* 1990; Saidapur & Hoque 1995; Rastogi *et al.* 2011). Además, en ausencia de dicho aumento de la temperatura se ha observado una disminución de la tasa de crecimiento y supervivencia (Jørgensen 1986). Por otro lado, existen otros factores más difícilmente controlables y que inducen estrés en la colonia cautiva, lo que genera la liberación de corticosterona, hormona inhibidora de la gametogénesis y los comportamientos sexuales (Carr 2011). Éstos se dividen en factores abióticos, *e.g.* el sonido, las condiciones lumínicas, los olores, el sustrato etc.; y factores relacionados propiamente con el confinamiento, *e.g.* movilidad reducida, imposibilidad de espacio para huir, etc. (Morgan & Tromborg 2007).

El sapo partero común, como se comentó previamente, se haya distribuido desde el nivel del mar hasta zonas de alta montaña, por lo que la época reproductora puede darse todo el año (en zonas de baja altitud), o ser estacional (en zonas de altitud elevada). En el Macizo de Peñalara, la reproducción se observa, como ya se ha indicado, desde primavera hasta el inicio del verano, si bien se han observado hembras grávidas a comienzos de septiembre (Martín-Beyer, *obs. pers.*), por lo que cabe suponer que la población del Macizo necesita de un periodo de hibernación para la reproducción.

Tratamiento *in situ* de la quitridiomicosis

La quitridiomicosis ha sido la responsable del declive tan acusado experimentado en el sapo partero común en el Macizo de Peñalara, y el desarrollo de un tratamiento *in situ* que vaya de la mano con el desarrollo de un programa de reproducción, se antoja necesario.

El Itraconazol, como se ha mencionado previamente, es uno de los fungicidas más usados en el tratamiento de la quitridiomicosis (Pessier & Mendelson 2009). La mayoría de los experimentos

publicados sobre este compuesto están orientados al tratamiento de adultos, habiendo poca información sobre el tratamiento en larvas. En la actualidad, no existe un tratamiento estándar efectivo que elimine la enfermedad, sino que se ha probado la efectividad a diferentes concentraciones en diferentes especies. Nichols & Lamirade (2001) por ejemplo, emplearon concentraciones de 0.01% para tratar adultos del género *Dendrobates*, mientras que Jones *et al.* (2012) usaron concentraciones de 0.0055% para el tratamiento de adultos de *Litoria caerulea*, White 1790, y *Anaxyrus baxteri*, Porter 1964, y Brannelly *et al.* (2012) trataron con Itraconazol al 0.0025% adultos de *L. caerulea* y *Incilius nebulifer*, Girard 1843. Desgraciadamente, se ha asociado el Itraconazol con toxicidad. Por un lado, Garner *et al.* (2009) observaron una despigmentación de la piel de las larvas de *A. muletensis* después de haber sido tratadas con Itraconazol durante siete días consecutivos a una concentración de 0.01% (siguiendo el protocolo de Nichols & Lamirade 2001). Loyau *et al.* (2016) observaron que el tratamiento en adultos de *A. obstetricans* con Itraconazol, junto a la exposición inmediatamente después de estos ejemplares a bajas temperaturas, aumentaba la mortandad de estos, insinuando un efecto colateral de este azol sobre la hibernación. Por otro lado, Hardy *et al.* (2015) comprobaron que para una población de *Rana cascadae*, Slater 1939, el Itraconazol tenía un efecto beneficioso en la supervivencia a largo plazo, si bien observaron que los ejemplares tratados habían perdido un 22% más de peso que los ejemplares empleados en el experimento como control, y habían crecido un 9% menos.

La temperatura, debido a la sensibilidad observada en *Bd* a las altas temperaturas (Becker *et al.* 2012) y a la variación latitudinal (Kriger *et al.* 2007), ha sido empleada como un método alternativo de tratamiento frente a la quitridiomycosis. Woodhams *et al.* (2003) comprobaron que el tratamiento en dos tandas, con agua a 37 °C durante ocho horas, eliminaba la infección en juveniles de *Litoria chloris*, Boulenger 1892, mientras que el tratamiento a una temperatura continua de 22 °C presentaba mortandades mayores. Así mismo, Chatfield & Richards-Zawacki (2011) trataron ejemplares adultos de *L. catesbeianus*, y *Acris crepitans*, Baird 1854, durante diez días consecutivos a 30 °C, observando la eliminación de la infección en el 100% de los ejemplares de *L. catesbeianus*, y un 93% de efectividad en *A. crepitans*.

Reintroducción de los ejemplares producidos

El número de programas de recuperación de anfibios ha aumentado en las últimas décadas (Harding *et al.* 2016). Confirmar su éxito o fracaso es dificultoso, y requiere de una gran inversión temporal (posiblemente más de una década) y humana (Griffiths & Pavajeau 2008; Canessa *et al.* 2016).

Los programas de reintroducción pueden dividirse en tres fases (Sarrazin 2007; Armstrong & Seddon 2008): liberación de los ejemplares producidos, crecimiento de la población diana y regulación de la misma. Es, tras esta última fase, cuando puede constatar su éxito. Primero, debe entenderse que la fase de liberación posiblemente sea el episodio más estresante dentro de un programa de recuperación de fauna silvestre (Batson *et al.* 2015), y su éxito depende, a parte del conocimiento y neutralización de las amenazas (Pérez *et al.* 2012), de un buen conocimiento ecológico y nivel trófico de la especie (Griffiths *et al.* 1989; Dodd & Seigel 1992; Denton *et al.* 1997; Griffiths & Pavajeau 2008), así como de una calidad del hábitat óptima (O'Donnell *et al.* 2017). Por ello, quizá el éxito dependa de una estrategia que sepa combinar un descenso de la exposición a los factores que generan el declive, y un aumento de la resistencia a los mismos (Harding *et al.* 2016). Semlitsch (2002) consideraba que el éxito de una reintroducción disminuye cuando la población de la que se parte es pequeña, mientras que Willoughby *et al.* (2017) estiman que el *fitness* de los ejemplares producidos también juega un papel importante, así como el número de ejemplares liberados y las características de los mismos (Batson *et al.* 2015). En su guía sobre la reintroducción, la IUCN/SSC (2013) aludía a que la población donante fuera cercana al lugar de suelta, con el fin de reducir la introducción de genotipos mal adaptados, mientras que otros estudios apuntan que quizá el propio tamaño de la población donadora influya en el éxito de la reintroducción, por lo que el empleo de poblaciones más alejadas debe verse como otra alternativa (Zeisset & Beebee 2013).

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS Y OBJETIVOS

En el 2008, y a pesar de las medidas puestas en marcha por la Comunidad de Madrid, la rana patilarga seguía ausente de la Hoya de Peñalara. Debido a la imposibilidad de eliminar el salvelino de las cotas más bajas del arroyo por la morfología abrupta del terreno, y teniendo en cuenta la disminución en la capacidad recolonizadora de los anfibios en presencia de peces (Ryan *et al.* 2014), la probabilidad de una recolonización natural desde la población de la Hoya de Pepe Hernando se antojaba incierta. Más teniendo en cuenta que la dinámica de las poblaciones de anfibios depende de numerosas variables, entre las que destaca el clima, el impacto de la actividad humana y la depredación (Rodríguez-Prieto & Fernández-Juricic 2005; Davis *et al.* 2017).

En el caso de *Bd*, en el 2008 seguía presente en la mayoría de las masas de agua del Macizo de Peñalara. Su concentración en el agua seguía siendo elevada, no observándose recién

metamórficos de *A. obstetricans* en los principales enclaves de reproducción. Entre las medidas sugeridas por Woodhams *et al.* (2011) para mitigar el impacto en el medio natural se encontraban:

- Disminución de la densidad del hospedador, imposible de llevar a cabo actualmente en un ecosistema abierto como el Macizo, donde el incremento de la temperatura media anual (Bosch *et al.* 2007) ha propiciado la expansión de especies que podrían actuar como vectores de la enfermedad, al volverse el hábitat menos exigente para las especies (Aldridge *et al.* 2011).
- Tratamiento de hospedadores y hábitats con vacunas, probióticos o microbios competidores (Vredenburg *et al.* 2011; Cashins *et al.* 2013). Dichos tratamientos estaban en la fase inicial de investigación, siendo su influencia incierta.
- Empleo de depredadores naturales de *Bd* como biocontroles (Schmeller *et al.* 2014), especialmente en invierno, cuando la expansión de *Bd* se halla limitada (Hite *et al.* 2016). Al igual que para los tratamientos, dichas medidas se encontraban aún en la fase inicial de su desarrollo.
- Cría en cautividad (Briggs *et al.* 2005), donde realizar selección de ejemplares inmunoresistentes (Woodhams *et al.* 2003).

Así, la situación de las poblaciones de *A. obstetricans* y *R. iberica* en el Macizo de Peñalara sugería la cría en cautividad de ambas especies con el fin de mantener una colonia cautiva de *A. obstetricans* y la producción de ejemplares de calidad con el objetivo de ser liberados cuando la concentración de *Bd* disminuyese lo suficiente como para que las larvas pudieran finalizar la metamorfosis; y la producción de post-metamórficos de calidad de *R. iberica* que pudieran ser liberados en la Hoya de Peñalara, lo que eliminaría el factor de riesgo de depredación larvaria en la citada Hoya si optásemos por traslocaciones directas de larvas. En el Macizo de Peñalara, la reintroducción del sapo partero común y la rana patilarga se enfrentaba a tres graves problemas:

1. La población fundadora, de la que se extrajeron los ejemplares para la colonia cautiva de *A. obstetricans*, era pequeña y estaba compuesta por pequeños núcleos, lo que confiere a este tipo de poblaciones inestabilidad y les hace más susceptibles al declive (Caughley 1994).
2. *Bd* no podía ser eliminado ni controlado en el hábitat del Macizo, lo que limitó considerablemente los lugares de reintroducción.

3. El salvelino, si bien había podido ser erradicado, al comienzo de la presente Tesis, de la Hoya de Pepe Hernando, no así lo había sido de la Hoya de Peñalara, donde seguía presente en el Arroyo de Dos Hermanas y el Arroyo de Peñalara.

El objetivo de la presente Tesis es el desarrollo de un programa de cría en cautividad para *R. iberica* y *A. obstetricans*, con el fin de producir ejemplares para su reintroducción en el Macizo de Peñalara. Los objetivos secundarios son:

1. Desarrollo de protocolos de trabajo óptimos para la cría en cautividad de *A. obstetricans* y *R. iberica*.
2. Desarrollar un tratamiento *in situ* efectivo frente a *Bd* para *A. obstetricans*: por un lado, comprobar la eficacia del Itraconazol y la temperatura elevada como tratamiento efectivo de la quitridiomycosis-y, por otro, estudiar en larvas de *R. iberica* la existencia de un efecto pernicioso del Itraconazol en el crecimiento y en la supervivencia a medio plazo.
3. Producir ejemplares viables (*i.e.* que completen su ciclo de vida) de *R. iberica* para su reintroducción a través de la experimentación en larvas, modificando la densidad, la presencia de refugios y el flujo de agua de los acuarios; así como en juveniles modificando la densidad y la aportación de agua diaria.
4. Reproducir ejemplares viables en cautividad de *A. obstetricans* a través de experimentos destinados a conocer la influencia de la hibernación en el desarrollo del comportamiento reproductor, y la obtención de una fórmula matemática que permita averiguar el sexo de los ejemplares cautivos del Centro de Cría en Cautividad.
5. Evaluar la calidad de los ejemplares producidos en cautividad de *R. iberica* y *A. obstetricans* a través de su capacidad de supervivencia en el Macizo de Peñalara.



Material y métodos

MAXIMIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS EJEMPLARES CRIADOS Y MINIMIZACIÓN DEL ESFUERZO HUMANO DE CRÍA

1) Optimización de la cría y del tamaño larvario

I. Experimentación con A. obstetricans

Mantenimiento previo a la experimentación

Se capturaron 60 larvas invernantes provenientes de dos poblaciones (30+30), una de Toro (Zamora) y otra de Valdesquí (Madrid). Las larvas se transportaron cuidadosamente hasta el Centro de Cría en Cautividad en dos contenedores de agua, separadas por localidades. Una vez en las instalaciones, se aclimataron a la temperatura del agua de los acuarios (16 ± 1 °C) durante 2h antes de ser liberadas en dos colindantes. En todo momento, el fotoperiodo se mantuvo constante bajo un periodo de luz/oscuridad de 12:12h y una temperatura media de 18 °C.

Hasta el comienzo del experimento, los acuarios se limpiaron con una bomba de vacío 3 veces por semana. Posteriormente, las larvas se alimentaron *ad libitum* con un compuesto formado por: 10 partes de escamas de pez (EHEIM FLAKES®, con un 41% de contenido en proteína bruta, 17% de grasa bruta, 1% fibra bruta y 6% de cenizas), 8 partes de comida para truchas (Allco® FS 40/8 EX - 4.5mm, compuesto por proteína bruta en un 41%, grasa bruta 8.5%, ceniza bruta 8.2%, fibra bruta en un 2.5% y fósforo en un 1.3%), 8 partes de comida de conejos (Versele Laga Cuni Nature®, con un componente proteico de 15.5%, grasas brutas un 4%, celulosa bruta un 15%, ceniza bruta un 6%, calcio un 0.80%, fósforo un 0.50% y metionina 0.23%), 3 partes de huesos de sepia, 2 partes de Tubifex (SERA FD®, con una composición de un 58.5% de proteínas en bruto, 8.1% grasas en bruto, 2.9% de fibras en bruto, 5.8% de humedad y 5.7% de cenizas en bruto), 2 partes de gambas (Tetra Gammarus®, con una composición analítica de proteína bruta del 44%, aceites y grasas brutos 6.0%, fibras brutas 6.5%, contenido de humedad 14% y calcio 5%) y 2 partes de *Spirulina* (SERA Spirulina Tabs®, conformado por un 48.2% de proteínas en bruto, un 8.1% de grasas en bruto, un 5% de fibras en bruto, un 5.3% de humedad y un 9.9% de cenizas). Una vez finalizado el experimento y tras la metamorfosis de las larvas, se liberaron los ejemplares de Toro, permaneciendo los ejemplares de Valdesquí en el Centro como parte de la colonia cautiva. Los ejemplares de Toro fueron tratados con baños de Itraconazol al 0.0001% (Itrafungol®, 10 mg/ml, Veterinaria Esteve) durante cinco minutos, siete días consecutivos, siguiendo el protocolo de Garner *et al.* (2009), antes de ser liberados en su lugar de origen.

Experimentación

Las 30 larvas de cada población fueron separadas al azar en dos grupos con igual número de ejemplares: un grupo experimental con agua en continua renovación (C) y otro grupo experimental con un sistema cerrado, *i.e.* sin agua renovándose (SC). Cada grupo de cada población se replicó tres veces, con cinco larvas por réplica que no fueron identificadas individualmente. Los acuarios empleados fueron los que posee el Centro de Cría en la Sala de Larvas, y se alternaban entre grupo experimental y población intentando minimizar los posibles efectos de factores no controlados. Para controlar la variabilidad inicial del tamaño y peso corporal y sus cambios en el tiempo, tanto al comienzo y al final del experimento, que duró 90 días, las larvas fueron secadas con una servilleta de papel, pesadas con una balanza JKD-50 (precisión: ± 0.02 gr) y fotografiadas con una cámara Sony DSC-W220 sobre un fondo de papel milimetrado. Las fotografías se realizaron a la misma distancia y con el mismo aumento en la cámara para evitar errores en el análisis métrico de las fotografías. Como medidas de referencia del crecimiento se emplearon la longitud larvaria total (SVL), la anchura de la cabeza (HW) y el peso en gramos (P).

Para el análisis de las imágenes se recurrió el programa de acceso libre ImageJ®. Aquellas larvas a las que, durante el experimento, se les observó alguna infección o anomalía, fueron excluidas del análisis.

II. Experimentación con R. iberica

Mantenimiento previo a la experimentación

A principios de mayo se capturaron en un brazo del arroyo de Pepe Hernando que se seca en verano, dos puestas de *R. iberica* y una semana después, en el mismo tramo, se capturaron 200 larvas adicionales en estadio de Gosner 20 (Gosner 1960), no habiéndose observado diferencias de desarrollo entre las larvas capturadas posteriormente y las de las instalaciones del Centro de Cría en Cautividad. Se transportaron cuidadosamente al Centro de Cría, donde se aclimataron por un periodo de cuatro horas a la temperatura de los acuarios (16 ± 1 °C) de manera similar a lo indicado en el experimento anterior. Una vez aclimatadas, se introdujeron en tres acuarios no colindantes. Las larvas se mantuvieron en un régimen de agua en continua renovación y en las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo y alimentación descritos previamente. Los acuarios donde se mantuvieron las larvas antes del experimento y durante el experimento son los empleados en el Centro de Cría, con un sustrato de fondo de grava fina, que se limpiaba tres veces por semana con una bomba de succión, y donde adicionalmente se añadió, como refugio,

dos casetas de barro. Cuando las larvas alcanzaron el estadio de Gosner 25, dio comienzo el experimento.

Experimentación

En este estudio se analizó la interacción de tres factores con dos niveles cada uno, lo que llevó a la aplicación de 8 tratamientos ($2 \times 2 \times 2 = 8$): densidad larvaria (alta y baja); efecto sobre el crecimiento larvario del Itraconazol (Itrafungol®, 10 mg/ml, Veterinaria Esteve), entre el estadio de Gosner 36 y el 42, con un grupo tratamiento y grupo control; y cantidad de refugios (alta y baja). Así se obtuvieron tres réplicas para cada uno de los tratamientos posibles, contando cada réplica con 49 larvas. Para evitar un posible sesgo genético en los resultados se mezclaron, en cada réplica, larvas de los tres acuarios donde se criaron previamente.

Para la variación de la densidad, se emplearon diferentes volúmenes, obteniéndose 0.70 larvas/litro y 1.35 larvas/litro. Si bien cada acuario tenía dos casetas de barro idénticas a las empleadas antes del comienzo del experimento, el grupo de alta presencia de refugios tenía, adicionalmente, 20 fragmentos de PVC de 20 mm de diámetro y 3 cm de longitud, y 4 trozos del mismo material pero de 12 cm de largo. Para estudiar los posibles efectos del Itraconazol en el crecimiento larvario, a los animales se les bañó en una solución de este azol al 0.0001% (Itrafungol®, 10 mg/ml, Veterinaria Esteve) siguiendo el protocolo de Garner *et al.* (2009). Puesto que se desconocía la respuesta larvaria al antifúngico, se procedió a realizar una prueba previa, escogiendo 10 larvas al azar y sometiéndolas a dicho tratamiento. El ensayo concluyó con éxito, ya que todas las larvas sobrevivieron al tratamiento. Dichas larvas fueron excluidas del experimento. La razón por la que no se realizó el tratamiento con Itraconazol antes del estadio de Gosner 36 fue por si el azol era mortal en estadios de desarrollo menores.

En total se usaron 24 acuarios con una distribución alternada. Se mantuvo siempre la independencia de cada réplica limpiando la bomba cada vez que se usaba en otro acuario y empleado mayas iguales pero exclusivas de cada acuario. Para comprobar el efecto de estos factores en el crecimiento de las larvas, se midieron veinte individuos de cada acuario en el estadio de desarrollo de Gosner 36 (cuando las extremidades traseras se están desarrollando) y, entre 12 y 16 larvas en el estadio de Gosner 42 (cuando se ha completado el desarrollo de las extremidades delanteras y comienza la transformación del disco oral en boca adulta). Las primeras mediciones se realizaron a lo largo de una semana y antes del tratamiento antifúngico, mientras que las segundas se hicieron mientras las larvas se iban metamorfoseando. Las variables contempladas fueron el peso (P), la anchura de la cabeza (HW), longitud de la cabeza (HL) y longitud larvaria total (SVL) para el estadio de Gosner 36, y el peso y la longitud larvaria

total para el estadio de Gosner 42, siguiendo el mismo procedimiento empleado en el experimento con las larvas del sapo partero común. Adicionalmente se estudió el porcentaje de metamórficos al día 46 del inicio del experimento. Los individuos que se metamorfosearon durante los baños de Itraconazol o cuatro días tras la finalización de estos, quedaron excluidos de los resultados.

Para la toma de datos, se emplearon las mismas herramientas y la misma metodología que en el experimento con larvas de *A. obstetricans*.

2) Optimización de la cría y del tamaño de los juveniles

1. Experimentación con *A. obstetricans*

Mantenimiento previo a la experimentación

Se capturaron 23 larvas invernantes de la población de Valdesquí, las cuales se transportaron a las instalaciones del Centro de Cría. Se les dejó aclimatarse a la temperatura del agua (16 ± 1 °C) de los acuarios durante dos horas, momento en que fueron liberadas en cuatro acuarios diferentes. Hasta la metamorfosis, las larvas fueron criadas en las mismas condiciones descritas previamente. En cuanto las larvas alcanzaron el estadio de Gosner 43, fueron trasladadas a cajas colectivas de la Sala de Adultos, donde permanecieron cerca de un mes antes del comienzo del experimento.

Experimentación

Los 23 juveniles se dividieron en dos grupos: 11 ejemplares criados en cajas colectivas (CC), y 12 criados en cajas independientes (CI). Cada ejemplar de cada grupo fue identificado individualmente mediante los patrones dorsales de las manchas del cuerpo, previa fotografía del ejemplar. Debido al bajísimo número de ejemplares disponibles, el grupo CC no pudo replicarse y, en consecuencia, los datos que se obtengan de cada ejemplar no pueden considerarse independientes al compartir la misma caja, incurriendo en pseudorréplica (Hurlbert, 1984). La variable estudiada fue el peso, medida realizada con una balanza JKD-50 (precisión: ± 0.02 gr), y recogida al inicio, durante y al final del experimento, que duró 96 días.

Tres veces por semana los ejemplares fueron alimentados con grillos domésticos espolvoreados previamente con un compuesto vitamínico (Nekton REP®). Cada dos semanas, las cajas eran limpiadas para eliminar las heces y restos de grillos no comidos. Cada ejemplar, ya fuera del

grupo CC o CI, era introducido en una pequeña caja de plástico. Una vez finalizada la limpieza, eran devueltos a sus respectivas cajas.

Los ejemplares que no concluyeron el experimento, fueron excluidos del análisis de los datos.

II. Experimentación con R. iberica

Mantenimiento previo a la experimentación

Una vez que las larvas del experimento larvario previo sobre la optimización de la cría alcanzaron el estadio de Gosner 43, fueron trasladadas desde la Sala de Larvas hasta las cajas de tratamientos en la Sala de Adultos. Dichas cajas, donde los ejemplares fueron separados por tratamientos, simulaban playas con una zona de agua y otra de tierra para que los recién metamorfoseados pudieran adaptarse al cambio de la respiración branquial a la pulmonar. Durante este periodo, que duró 10 días de media, los ejemplares no fueron alimentados, ya que el sistema digestivo sufre grandes transformaciones y no pueden ingerir alimento. Cada dos días se buscaban ejemplares que hubieran finalizado la metamorfosis (*i.e.* que la cola estuviese completamente reabsorbida). Dichos ejemplares, y previo a la liberación en cajas colectivas, fueron marcados mediante el método del “toe-clipping” (amputación de falanges para crear códigos de identificación). Una vez en las cajas colectivas, y tras tener el número de ejemplares necesario, dio comienzo el experimento.

Debido a la elevada mortandad de los recién metamorfoseados durante los primeros días, se escogieron ejemplares que habían sido criados tanto en alta como baja densidad, pero de tamaño similar, para proceder con el experimento.

Experimentación

Del experimento con larvas de rana patilarga descrito previamente se emplearon 120 ejemplares, elegidos al azar, para estudiar la tasa de supervivencia en función de la interacción de dos factores:

- 1) La previa exposición o no exposición, como larvas, al Itraconazol.
- 2) La cantidad de agua aportada durante el desarrollo. Para crear dicha diferencia, durante tres minutos y dos veces al día, se procedió a recrear una lluvia fina (GL), o bien se procedió a un goteo del agua (GG). Para evitar la desecación de los ejemplares, las cajas colectivas en ambos grupos contenían dos pequeños aportes de agua en forma de piscinas.

Cada grupo GG y GL, que fue replicado 3 veces, contenía diez nuevos metamórficos que no habían sido tratados con Itraconazol, y diez que sí lo habían sido. La distribución de los grupos fue alterna, y ocuparon la misma fila de cajas en la Sala de Adultos. Debido a la falta de espacio en las instalaciones del Centro de Cría, no pudo replicarse cada factor por separado. Si bien puede argumentarse que los resultados obtenidos podrían estar influenciados por la densidad, se entendió que su influencia sería mínima en los factores analizados debido al pequeño tamaño de los ejemplares. Cada ejemplar encontrado muerto era analizado con una lupa para confirmar si eran los ejemplares tratados con Itraconazol o no.

Durante los 31 días que duró el experimento, el fotoperiodo se mantuvo en periodo de luz/oscuridad de 11:13h, y la temperatura media fue de 21 ± 1 °C. Los recién metamórficos fueron alimentados tres veces a la semana *ad libitum* con *D. melanogaster*, y grillos domésticos de tamaño 0 y 1, criados en las instalaciones. La limpieza de las cajas se realizó cada diez días, y durante esa actuación, los recién metamorfoseados de cada caja se instalaban en una caja de plástico de pequeño tamaño.

PRODUCCIÓN DE EJEMPLARES EN CAUTIVIDAD

I. Discriminación sexual en sapo partero común

Mantenimiento previo a la experimentación

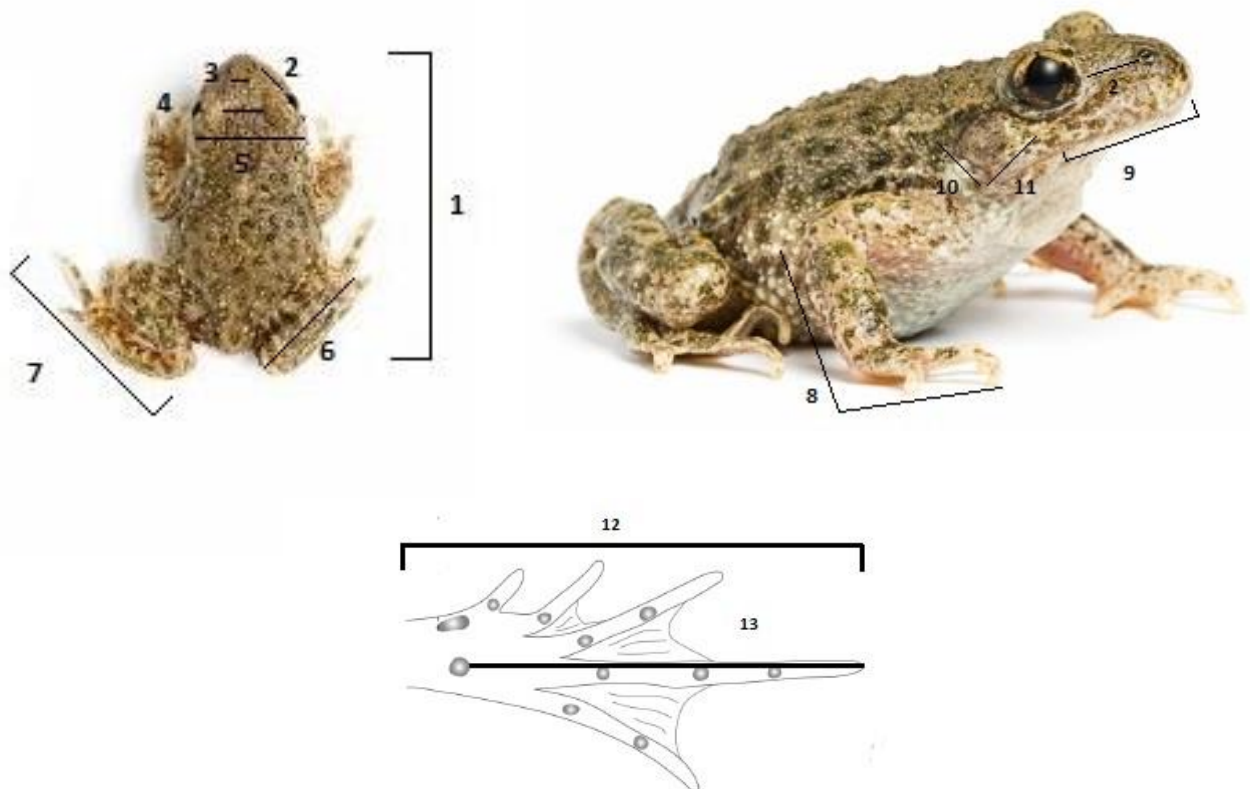
Los ejemplares fueron capturados como larvas invernantes en diferentes áreas dentro del Macizo de Peñalara. Se trasladaron al Centro de Cría, donde permanecieron dos años en las condiciones de cautividad desarrolladas durante la presente Tesis. Los análisis genéticos realizados a los ejemplares del Macizo no mostraban una diferenciación genética tangible entre las áreas (Albert *et al.* 2015), por lo que se descartó el factor genético como condicionante para este experimento. Durante los años previos al experimento, todos los ejemplares fueron tratados preventivamente con Itraconazol a 0.0001% (Itrafungol®, 10 mg/ml, Veterinaria Esteve), siguiendo el protocolo descrito en Garner *et al.* (2009).

Experimentación

Se emplearon nueve ejemplares, cuatro machos y cinco hembras, provenientes del Centro de Cría y se realizaron mediciones de 13 variables morfológicas (figura 12). Dichas variables se midieron con un calibre de precisión en el lado derecho de los ejemplares. Se realizaron tres

medidas no consecutivas de cada variable y, si distaban más de 1 mm, se repetían. Para manipular a los ejemplares se usaron guantes de vinilo, que se desechaban al finalizar las mediciones con cada ejemplar. El número de ejemplares es bajo debido a que, si bien se realizaron medidas a 30 ejemplares de ellos, la prioridad en el momento del experimento era el reforzamiento de la población de sapo partero común en el Macizo de Peñalara, por lo que la mayoría de ellos fueron liberados en el Macizo antes de poder constatar su sexo.

La confirmación del sexo de los ejemplares fue posterior al registro de los datos, ya fuera por la observación de machos con puestas, por la observación de hembras grávidas o tras diseccionar ejemplares muertos. En todos los casos, los ejemplares se consideraron adultos.



<i>Variables</i>		<i>Descripción</i>
<i>morfológicas</i>		
SVL	(1)	Longitud del hocico al urostelo
HW	(5)	Anchura de la cabeza medida entre tímpanos
JL	(9)	Longitud de la mandíbula inferior
ED	(4)	Distancia mínima entre ojos
HT	(11)	Diámetro horizontal del tímpano
VT	(10)	Diámetro vertical del tímpano
ND	(3)	Distancia entre nostrilos
END	(2)	Distancia mínima entre el ojo y el nostrilo
TFL	(6)	Longitud tibio-fíbula
HLL	(7)	Longitud de la extremidad posterior desde el urostelo hasta el tercer dedo
TL	(13)	Distancia entre el tubérculo tarsal y el extremo del tercer dedo de la extremidad posterior
FTL	(12)	Distancia entre la parte anterior del tubérculo metatarsal y el extremo del tercer dedo de la extremidad posterior
EFD	(8)	Distancia entre el codo y el extremo del tercer dedo de la extremidad posterior

Figura 12: Descripción y relación de las medidas morfológicas empleadas en *A. obstetricans* para el estudio de la discriminación sexual en la colonia cautiva del Centro de Cría. Cada medida morfológica tiene asociado su descripción y el número que se corresponde con la imagen.

II. Hibernación del sapo partero común

Mantenimiento previo a la experimentación

Los ejemplares empleados se mantuvieron en cajas de adultos, en la Sala de Adultos, hasta el comienzo de la hibernación. Fueron alimentados del mismo modo en que lo fueron los juveniles. Diez días antes de la hibernación, se dejó de alimentarles, ya que el tracto digestivo debe quedar libre de alimento susceptible de descomponerse en el interior del animal durante la hibernación.

Previo a este experimento, se sometió un año antes a los adultos cautivos de la colonia a una hibernación controlada con el fin de testar si podían sobrevivir a un periodo de hibernación y confirmar que las cajas donde iban a hibernar en el experimento posterior eran adecuadas para tal fin. Todos los ejemplares, salvo uno, sobrevivieron y se observó tres eventos de reproducción, lo que indicaba la aparente idoneidad de las cajas para su hibernación.

Experimentación

Para estudiar la necesidad de hibernación y así estimular la reproducción en la colonia cautiva del sapo partero común, se emplearon 80 ejemplares adultos que se distribuyeron al azar en 3 grupos: un grupo que hibernó en condiciones controladas (HC) en el Centro de Cría y que estaba formado por 25 ejemplares, otro grupo que hibernó de manera natural (HN), en un recinto vallado situado dentro de las instalaciones del Centro de Cría, y donde se introdujeron 27 ejemplares, y en un acuaterrario (A) localizado en el Puerto de Cotos, dentro del Macizo de Peñalara, en el que se introdujeron 28 individuos que no hibernaron. El bajo número de ejemplares y la complejidad de la hibernación impidió replicar los grupos, si bien los ejemplares fueron identificados individualmente. Así mismo, dada la imposibilidad de conocer el sexo de la totalidad de los ejemplares, se colocó al menos a un macho y una hembra en cada grupo.

Los ejemplares del grupo HC, hibernaron 4 meses en cajas especialmente diseñadas para tal fin: eran cajas de tratamientos compuestas por una capa basal de 1 cm de grava de diámetro grande, una capa de tejido, y por encima de ésta una capa de 10 cm de tierra. Se añadió además una cobertura de musgo *Sphagnum*, adquirido en tiendas especializadas, una cobertura de hojas, un refugio de arcilla y un recipiente pequeño con agua (figura 13). Todos los elementos empleados fueron higienizados con calor antes de su uso para reducir el riesgo de infecciones.



Figura 13: Caja de hibernación empleada en los experimentos de hibernación controlada en el Centro de Cría.

Las cajas de hibernación se mantuvieron en un frigorífico a una temperatura media de 6.6 °C. Una vez por semana, se abría cada caja para comprobar el estado de los ejemplares. Cualquier individuo que presentase signos de delgadez extrema, era extraído de la caja, y devuelto a una caja de adultos libre en la Sala de Adultos, previa aclimatación durante un día entero a la temperatura ambiente. Así mismo, se procedía a humedecer el *Sphagnum* y rellenar el agua que se hubiera perdido en el recipiente de agua. Los ejemplares fueron pesados al inicio y al final del experimento mediante una balanza JKD-50 (precisión: +/- 0.02 gr) para analizar la pérdida de peso. Una vez finalizada la hibernación, fueron introducidos en cuatro cajas de adultos (descritas en la Introducción) y mantenidos en la Sala de Adultos del Centro de Cría para comprobar si se reproducían.

El grupo HN fue liberado a un área vallada localizada en las instalaciones del Centro de Cría (figura 14). Sobre dicha área se colocaron bloques de piedras graníticas, unas sobre otras, hasta hacer una pequeña pirámide. Esta pirámide había sido previamente envuelta en lona, y tapada con abundante tierra, que se compactó para dar forma así al refugio. Los ejemplares se liberaron a finales de octubre, y hasta el comienzo del invierno se humedeció el recinto una vez por semana. Tras cinco meses de hibernación, antes del comienzo del periodo reproductor, se añadió un pilón de agua para que los machos pudieran liberar las puestas y, ocasionalmente, se suplementó la comida que de manera natural obtenían, con grillos domésticos provenientes de la colonia del Centro de Cría.



Figura 14: Recinto vallado donde se realizó la hibernación natural, y que se haya adjunto a las instalaciones del Centro de Cría en Cautividad.

Cada diez días aproximadamente, se pasaba una manga por el pilón de agua para buscar larvas o los restos de los huevos. Cualquier posible depredador potencial, como ditiscos o larvas de libélulas, eran retirados y posteriormente se añadía al pilón agua.

El grupo A se localizaba en el puerto de Cotos, en el centro de visitantes del Parque Nacional. El acuaterrario es una estructura de cristal de 1.2 m³ dividido en una zona de agua y otra zona de tierra (figura 15). El interior se mantiene a 23 °C y es iluminado con un fluorescente UVA-B similar a los empleados en el Centro de Cría. La zona de agua, como puede observarse en la figura 15, presenta una base de grava de diámetro pequeño, junto a varias maderas y rocas que hacen la vez de refugios para las larvas. Existe una pequeña playa que comunica la zona de tierra con el agua, para facilitar a los machos el acceso al agua para depositar las larvas, y a los metamórficos la transición a la tierra. La zona de tierra está compuesta por una base de grava igual que la usada en la zona de agua, y numerosas piedras de gran tamaño, colocadas unas encima de otras, lo que aumenta el número de refugios disponibles. Además, se ha plantado musgo y añadido madera, simulando en la medida de lo posible el ambiente del Macizo de Peñalara. Los ejemplares fueron alimentados siguiendo el procedimiento ya descrito en juveniles.



Figura 15: Aquaterrario, localizado en el Puerto de Cotos. Puede observarse la zona de agua y al fondo, la zona de tierra.

Tanto en el grupo HN como A, no se realizaron medidas de peso al final del experimento para evitar molestar a los adultos.

Para el análisis se empleó el número de puestas totales obtenidas durante la temporada reproductora, incluidas las encontradas en el suelo (e.g. aquellas en las que el amplexo no se realizó correctamente y el macho no pudo enrollar la puesta a sus patas traseras).

DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO *IN SITU* EFECTIVO FRENTE A LA QUITRIDOMICOSIS

Mantenimiento previo a la experimentación

Se capturaron 60 larvas invernantes provenientes de varias puestas de una población de *A. obstetricans* cercana a Toro, Zamora. Dichas larvas fueron transportadas hasta el Centro de Cría, donde se aclimataron a la temperatura del agua de los acuarios (16 ± 1 °C) durante dos horas. Posteriormente fueron liberadas en dos acuarios colindantes de la Sala de Larvas, cuyo fotoperiodo se mantuvo constante en un régimen de luz/oscuridad de 12:12h, y una

temperatura de 18 °C. Durante una semana, para permitir la aclimatación completa a las condiciones del Centro de Cría, se alimentó a las larvas *ad libitum* cada dos días con la mezcla descrita previamente. Dado que las larvas estaban infectadas, la manipulación de las larvas se hizo con guantes de vinilo que eran desechados tras su uso. Se separó material específico del Centro para este experimento, que tras cada uso, era tratado con lejía para desinfectarlo.

Experimentación

Las larvas fueron divididas al azar en tres grupos de 20 larvas cada uno: grupo control (C), grupo tratamiento con Itraconazol (ITZ) y grupo tratamiento temperatura (T). Al inicio del experimento, cada larva fue colocada en el Sala de Larvas y separada en un tupper de plástico de 0.5 litros, donde permanecieron hasta el final del experimento. Cada día, tras el tratamiento, se variaba la localización de los tupper, con el fin de disminuir el efecto que una posible diferencia de temperatura en la sala, pudiera tener en los resultados. Se empleó un único grupo control porque el manejo de las larvas fue similar para ambos grupos, siendo la única diferencia el que las larvas permaneciesen o no dentro de un recipiente con agua.

El tratamiento con Itraconazol consistió en baños de cinco minutos, durante siete días consecutivos, a 0.0001%. Durante la duración del experimento, se empleó una manga para acuarios por cada ejemplar, y siempre se comenzaba el tratamiento por el grupo control. Cada día se cambiaba el agua de cada tupper, y se alimentaba a la larva cada dos días. Antes del experimento se analizó la carga de *Bd* en las larvas mediante un frotis bucal con una torunda de algodón. Casi un mes después de finalizar el experimento, las larvas fueron sacrificadas para extraer el disco oral. Dicho tejido se guardó en alcohol 96°, en una cámara frigorífica a 5 °C, hasta su procesamiento en laboratorio. El análisis se realizó usando la Q-PCR (Boyle *et al.* 2004). El DNA de *Bd* fue extraído usando PrepMan Ultra, y amplificado usando el CFX96™ Real-Time PCR Detection System, desarrollado por BIO-RAD®. En cada ensayo, las muestras se comparaban con un control negativo, y cuatro diferentes estándares de equivalentes genómicos (100, 10, 1 y 0.1). Para evitar falsos positivos, las muestras y los estándares, así como el control, se analizaban por duplicado. Si una muestra salía positiva, y otra negativa, se analizaba nuevamente. Así, los datos extrapolados de concentración se obtuvieron con la media de ambos valores.

Para el tratamiento de temperatura, las larvas fueron sometidas durante seis días, a periodos de 8 horas a 30 °C. Para alcanzar esta temperatura del agua, cada uno de los tupper era calentado al baño maría en un tanque con el agua a esta temperatura. Esto permitía que poco a poco el agua fuera calentándose, evitando un posible shock térmico. Así mismo, cada cuatro horas, cada uno de los tupper se cambiaba de posición para minimizar el efecto de la diferencia

de temperatura dentro del tanque. Una vez finalizado el tratamiento térmico, las larvas se dejaban reposar en la Sala de Adultos una hora antes de volver a dejarlas en la Sala de Larvas. Posteriormente se procedía a cambiar el agua de cada tupper. Para la recolección de las muestras se procedió de la misma manera que la descrita para el grupo ITZ. Cualquier ejemplar que no terminó el experimento fue excluido del análisis.

REINTRODUCCIÓN DE LOS EJEMPLARES PRODUCIDOS Y CONFIRMACIÓN DE SU VIABILIDAD

I. Reintroducción de *A. osbtetricans*

Mantenimiento previo a la experimentación

Los ejemplares de sapo partero común fueron criados en cautividad siguiendo los criterios descritos previamente, tanto el régimen de luz/oscuridad, como el de temperatura, alimento y confinamiento. Debido a que la presencia de *Bd* limitó durante toda la duración de la Tesis los puntos de reintroducción, no se realizaron estudios de selección de hábitat para esta especie.

Reintroducción y seguimiento

Para la identificación, los ejemplares, una semana antes de su liberación, fueron fotografiados o marcados con códigos de colores usando elastómeros fluorescentes (VIE, Northwest Marine Technology, Inc.). Todos los colores se introdujeron subcutáneamente en la región ventral del muslo del ejemplar, donde la piel es transparente.

El lugar seleccionado para la reintroducción fue la Laguna Chica, localizada en la Hoya de Peñalara (figura 8). Esta laguna suele secarse a finales del verano, por lo que carece de larvas invernantes, lo que disminuye la carga de *Bd*. Además, antes del declive del sapo partero común, era un enclave de reproducción para la especie, y se haya próxima a la Laguna Grande, que fue otro enclave de reproducción del sapo partero común.

Los animales a liberar, fueron trasladados en cajas de plástico duro, y con papel humedecido, a última hora de la tarde para evitar los momentos de máximo calor. Se procedió a su reintroducción en las zonas rocosas que circunvalan la orilla de la laguna (figura 16), con el fin de que tuvieran un refugio inmediatamente. Las reintroducciones se realizaron entre 2008 y 2012, a mediados de agosto y mediados de septiembre. La única excepción fue en el 2009, cuando se liberaron ejemplares en tres meses consecutivos.



Figura 16: La Laguna Chica de la Hoya de Peñalara, en el Macizo de Peñalara. Obsérvese las rocas alrededor de la misma (Wikipedia©)

Cada año se hicieron entre cinco y diez inspecciones oculares entre junio y septiembre, siempre al anochecer. Cada ejemplar capturado fue analizado en busca de *Bd* empleando una torunda de algodón, que se frotaba sobre la región ventral. Dichas torundas fueron analizadas en el laboratorio siguiendo el protocolo especificado en la sección anterior.

II. Reintroducción de *R. iberica*

Mantenimiento previo a la experimentación

Los ejemplares de rana patilarga fueron criados en cautividad siguiendo los criterios descritos previamente, tanto el régimen de luz/oscuridad, como el de temperatura, alimento y confinamiento.

Selección de hábitat

Para la determinación de la preferencia de hábitat de los diferentes estadios de *R. iberica*, se realizó un estudio del microhábitat del Arroyo de Pepe Hernando, basado en la metodología empleada en Bosch *et al.* (2006b). El arroyo se dividió en secciones de 25m, donde se medía el área de cinco unidades morfológicas fluviales:

- Pozas de caída: aguas profundas producto de una obstrucción parcial o total del cauce. Velocidades bajas y forma cóncava del lecho de fondo.

- Remanso: zona con baja velocidad del agua, en el margen de los arroyos, producidos por vórtices.
- Corriente: Escurrimiento somero con velocidades moderadas. Se aprecia algo de turbulencia superficial y altas pendientes.
- Run: El lecho de fondo es plano longitudinalmente y lateralmente cóncavo.
- Cascada: Secuencia de rápidos con pequeñas caídas de agua y muy pequeñas pozas.

Entre el 29/06/2009 y el 17/08/2009, se realizaron conteos visuales dos veces por semana, tanto a mediodía, como al anochecer, del número de larvas, recién metamórfico, juveniles y adultos encontrados. Siempre fue la misma persona quien realizó los conteos. Cuando en una unidad morfológica determinada había muchos ejemplares, se procedió a contarlos tres veces, usándose la media de estos tres como dato en los análisis estadísticos.

Reintroducción y seguimiento

Los ejemplares se liberaron en el Arroyo de Peñalara y Dos Hermanas según los resultados obtenidos en el estudio del uso del microhábitat. Para ello, se procedió a analizar, como se ha descrito previamente, las unidades morfológicas de ambos arroyos y en función de esto, se planificaron las reintroducciones. Los animales antes de ser liberados, en general, no fueron marcados, ya que los recién metamórficos eran muy sensibles a la manipulación, y se estresaban con facilidad. Tan sólo lo fueron un año con la técnica del toe-clipping, y otro con un código de colores similar al seguido con *A. obstetricans*, empleándose el mismo procedimiento descrito líneas más arriba.

Se realizaron 18 conteos visuales comprendidos entre julio del 2009 y septiembre del 2012 (cinco conteos en 2009, once en el 2010, doce en el 2011 y tres en el 2012). En el 2008 no se realizó ningún seguimiento por falta de tiempo, ya que nada más liberar a los ejemplares la temperatura en el Macizo de Peñalara bajó drásticamente, con lo que se asumió que se habrían refugiado para proceder a invernarse. De cada ejemplar liberado, se anotó la unidad morfológica en la que fue visto.

Eliminación del salvelino

Continuando con los esfuerzos de erradicación del salvelino en la Hoya de Peñalara, se procedió a su eliminación mediante la pesca eléctrica. Dos personas, una equipada con la manga electrificada personalizada (DC 200–400 V, <1 amp), y otra equipada con una manga normal, recorrieron el tramo del arroyo de Peñalara y Dos Hermanas en sentido opuesto al de la

corriente. Cada vez que se capturaba una trucha, se devolvía al arroyo unos metros aguas abajo, para evitar que volviera a ser capturada. Los salvelinos capturados, eran eliminados.

Se realizó una única pasada durante el periodo comprendido entre los años 2008 y 2012, siempre a finales de agosto, cuando el caudal de los arroyos era bajo, lo que hacía más afectiva la transmisión de la corriente a través del agua, ya de por sí, con poca concentración salina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el tratamiento de los datos se emplearon dos paquetes estadísticos: SPSS versión 22 y el paquete R versión 3.3.

Para seleccionar al azar los diferentes sujetos en los distintos experimentos, se generó una secuencia aleatoria de 20 números con la función ALEATORIO de Excel. Los acuarios, en el caso de los experimentos con larvas, se dividieron en 20 secciones numeradas de las cuales se capturó una larva de cada sección en el orden aleatorio generado. Si para los experimentos se requería un mayor número de larvas, se volvía a generar otra secuencia y se procedía a extraer las larvas siguiendo el mismo procedimiento hasta completar el número de larvas requeridas. En el caso de los experimentos con juveniles de rana, el procedimiento varió ligeramente, ya que los ejemplares se pusieron en dos cajas iguales divididas en 20 secciones numeradas.

Experimentación con larvas de *A. obstetricans*

Para el análisis estadístico de los datos se emplearon las medias de cada réplica, analizándose los resultados con el programa estadístico R mediante la aplicación del test de Wilcoxon.

Experimentación con larvas de *R. iberica*

Los datos obtenidos se transformaron logarítmicamente para su normalización y, posteriormente, se realizó un ANOVA con dos factores (densidad y abundancia de refugios) para el estadio de Gosner 36 y con tres factores (densidad, abundancia de refugios e Itraconazol) para el estadio de Gosner 42, empleando como cofactores la temperatura media del agua y el porcentaje de supervivencia larvaria de cada acuario. Para este estudio se empleó el programa SPSS.

Experimentación con juveniles de *A. obstetricans*

Para el análisis de los datos se usó la prueba de Kruskal-Wallis con el programa R.

Experimentación con juveniles de *R. iberica*

El análisis de los datos se hizo mediante el Modelo de Regresión de Cox en SPSS, empleando como covariantes la cantidad de agua aportada y el tratamiento con Itraconazol.

Discriminación sexual en adultos de sapo partero común

Los datos se transformaron logarítmicamente para corregir el efecto alométrico del crecimiento continuo y minimizar la dispersión de los datos. Estos datos transformados fueron usados para obtener la función discriminante mediante el programa R para machos y para hembras. Así mismo se empleó la U de Mann-Whitney en cada una de las medidas para observar si existían diferencias significativas entre machos y hembras.

Hibernación del sapo partero común

Se aplicó un Kruskal-Wallis en el programa estadístico R para observar si existían diferencias significativas entre el número de puestas entre los tres grupos de investigación.

Desarrollo de un tratamiento *in situ* efectivo frente a la quitridiomicosis

Para el análisis estadístico de la efectividad de los tratamientos con Itraconazol y temperatura en *A. obstetricans* se usó la diferencia entre el número de equivalentes de *Bd* iniciales y finales, y a este valor se le aplicó el test de Kruskal-Wallis en SPSS. Para los análisis post-hoc, se empleó el test de Dunn.

Reintroducción de los ejemplares de rana patilarga producidos: selección de hábitat

Para analizar los datos, primero se calculó la proporción de hábitat disponible con respecto a la proporción total de hábitat; y cada estadio de desarrollo observado, se dividió por el total de ejemplares de ese estadio observado.

Se analizó el uso de hábitat por parte de los ejemplares de *R. iberica* mediante Kruskal-Wallis en SPSS.



Resultados y discusión

MAXIMIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS EJEMPLARES CRIADOS Y MINIMIZACIÓN DEL ESFUERZO HUMANO DE CRÍA

Las larvas de los anfibios suelen crecer en ambientes cambiantes, por lo que han desarrollado una plasticidad fenotípica al ambiente, que les hace poder adaptarse mejor al medio y a las amenazas del mismo (Michaels & Preziosi 2015). Esto implica necesariamente, que las larvas poseen una sensibilidad al medio, y que, por tanto, el medio artificial en el que se crían en cautividad afecta al *fitness* de los ejemplares (Michaels & Preziosi 2015).

Obtener ejemplares metamórficos similares a los observados en la naturaleza es uno de los retos de los programas de cría en cautividad. Para ello hay que tener en cuenta que la metamorfosis larvaria es un proceso de desarrollo continuo (Smith-Gill & Berven 1979), activada por factores extrínsecos e intrínsecos (Wilbur & Collins 1973). En muchos poiquiloterms, la propia tasa de crecimiento y diferenciación están desacopladas, de tal modo que, larvas metamorfoseadas con el mismo tamaño final, pueden haberse desarrollado a diferentes velocidades (Arendt 1997). La habilidad de una larva para responder plásticamente al ambiente está estrechamente relacionado con los costes (Loman 2002): por un lado, las tasas de crecimiento serán mayores cuando suponga un beneficio para los individuos, como por ejemplo cuando aumente con ello la probabilidad de supervivencia por depredación, o suponga una ventaja frente a la competencia (Arendt 1997); por otro lado, la tasa de crecimiento podría generar costes en la reproducción, retrasándola porque se destinasen más recursos energéticos al crecimiento (Arendt 1997), podría disminuir la habilidad para competir, o la resistencia frente a patógenos (Laurila *et al.* 2006).

En el caso del desarrollo de un método de cría en cautividad de las larvas de sapo partero común y rana patilarga, nos enfrentábamos a dos especies que emplean dos nichos ecológicos diferenciados: las larvas de rana patilarga se hallaban, en el Macizo de Peñalara, principalmente en pozas de caída (Bosch *et al.* 2006b), mientras que el sapo partero común estaba distribuido en pozas de caída, charcas y lagunas permanentes (García-París *et al.* 2004). Así mismo existía la limitación del número de ejemplares que pudieron ser usados en la experimentación, ya que el tamaño medio de la puesta de rana patilarga oscila entre los 192 y los 445 huevos, y en la Hoya de Pepe Hernando, la población era estable; mientras que en el caso del sapo partero común, los machos acarrean entre 35 y 95 huevos, con una media de 63 (García-París *et al.* 2004), y se hallaba prácticamente extinto en el Macizo de Peñalara.

1) Optimización de la cría y del tamaño larvario

1. Experimentación con *A. obstetricans*

Los valores de peso (P), longitud larvaria total (SVL) y anchura de la cabeza (HW) entre los grupos testados (C=con agua en continua renovación, SC=con agua estancada) fue similar al inicio del experimento: $P_c = 0.8 \pm 0.3$ gr, $HW_c = 16.8 \pm 2.8$ mm y $SLV_c = 49.0 \pm 9.5$ mm, y $P_{sc} = 0.8 \pm 0.23$ gr, $HW_{sc} = 16.9 \pm 1.9$ mm y $SVL_{sc} = 45.5 \pm 2.4$ mm, respectivamente. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el peso (Wilcoxon= 10, $p = 0.24$), la anchura de la cabeza (Wilcoxon= 16, $p = 0.82$) o la longitud larvaria total (Wilcoxon= 10, $p = 0.24$), si bien tanto la media del peso, como la diferencia de longitud total al inicio y al final del experimento fue 0.2 gr y 0.5 mm también mayor en SC que en C.

Analizando el experimento, la primera pregunta que puede surgir es por qué no se realizó la misma experimentación en esta especie que la empleada con *R. iberica*, para estudiar las densidades óptimas de cría y los beneficios que la presencia de refugios pudiera tener. Se ha sugerido, para el género *Alytes*, densidades óptimas de cría de 1 larva/litro, ya que a densidades mayores los ejemplares podrían desarrollarse a menores tamaños (Wells *et al.* 2015). Además, la baja disponibilidad de ejemplares de sapo partero común limitó en todo momento el número de experimentos a poder realizar, decidiendo como más relevantes los experimentos presentados en esta Tesis.

Dado que otros factores que podrían influir en el desarrollo larvario, como la temperatura del agua o la cantidad de comida, se mantuvieron bajo control en las instalaciones, resultaba más interesante estudiar si existía una relación entre el crecimiento y el tipo de agua: sistema cerrado (sin agua renovándose) o bien un sistema con renovación continua de agua. Los resultados obtenidos mostraron que, con independencia del tipo de régimen de agua empleado, no existía una influencia estadísticamente significativa sobre el crecimiento larvario, si bien las larvas criadas en condiciones de no corriente parecían alcanzar mayores tamaños. Los sistemas cerrados, como sería un acuario sin renovación continua de agua, requieren de un cambio regular de la misma (Browne & Zippel 2007), dependiendo la regularidad de dicho cambio, en última instancia, del nivel de nitrógeno producido por los desperdicios larvarios (Wells *et al.* 2015). Los intentos previos de cría de la especie realizados en las instalaciones del Centro de Cría y bajo este criterio, requirieron de un filtro de agua que eliminase los desperdicios y mantuviese el agua del acuario en cierto movimiento. Sin embargo, el agua a los pocos días se observaba sucia y había perdido transparencia (Martín-Beyer, *obs. pers*). Así, se decidió que la

forma óptima de cría de la especie sería con agua circulando continuamente ya que el tiempo diario empleado en el mantenimiento de los acuarios disminuyó en, aproximadamente, una hora. Tan sólo era necesario eliminar las heces y los restos de comida con un aspirador para acuarios. Así, se molestaba menos a las larvas y el agua estaba más transparente.

Una posible crítica al planteamiento del experimento es la adaptabilidad morfológica de las larvas en función del medio. En poblaciones no cautivas de *A. obstetricans*, se ha observado una variación en la forma larvaria en función del hábitat en el que se desarrollan: cuerpo globoso, cola corta y cresta caudal larga en pozas profundas de alta montaña; y aspecto aplanado, cola proporcionalmente larga y cresta caudal baja en arroyos de corriente (García-París *et al.* 2004). Así, ¿cómo discernir entre adaptación al medio y cambios producidos por un ambiente poco propicio para el desarrollo larvario? La principal defensa es la tasa de supervivencia larvaria. Antes de la implantación de la cría en cautividad con renovación continua de agua, el porcentaje de muertes era del 18%, reduciéndose al 4% tras su implantación (figura 17). Es por ello que, aunque no hubo diferencias significativas entre grupos, la cría con agua en continua renovación resultó ser una forma más eficiente de cría. Cabría contra-argumentar, y acertadamente, que la diferencia en la tasa de muertes observada pudieran estar influenciadas por la infección de *Bd*, ya que nunca se analizó el grado de infección de las larvas criadas en cautividad, y se ha comprobado que *Bd* tiene un coste en el *fitness* de ejemplares infectados en fase adulta (Chatfield *et al.* 2013) o larvaria (Venesky *et al.* 2009). Sin embargo, no se observó pérdida de coloración de la dentición larvaria, que puede ser un síntoma de infección (Rachowicz & Vredenburg 2004) y las muertes, de producirse, deberían ser principalmente durante la metamorfosis, no durante el desarrollo larvario.



Figura 17: Relación del número de larvas muertas con respecto al número de larvas disponibles en la Sala de Larvas del Centro de Cría durante los años 2008 y 2009. L: larvas.

Uno de los problemas observados a lo largo de los años, y asociado a la cría en cautividad con renovación continua de agua, fue la aparición de la denominada *bubble disease*, enfermedad caracterizada por la formación en la dermis de cavitaciones, *e.g* burbujas de gas (figura 18).

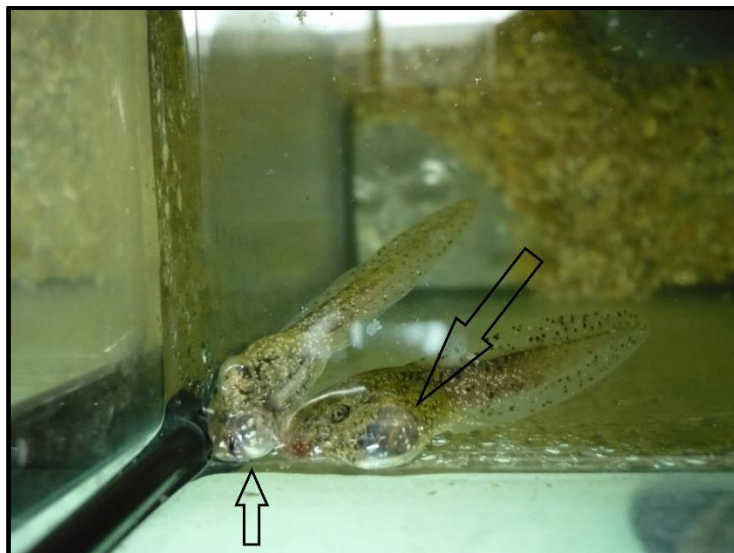


Figura 18: *Bubble disease* en larvas de sapo partero común en acuarios de la Sala de Larvas en el Centro de Cría. Obsérvese la formación de las cavitaciones bajo el disco oral de las larvas

Se produce por una falta de compensación de la presión hiperbárica de los gases disueltos en el agua, y genera rotura de vasos sanguíneos, muerte del tejido y, en última instancia, la muerte del animal (Densmore & Green 2007; Bouck 2011). Acorde con Bouck (2011), existen tres fases en esta enfermedad: 1) un periodo de equilibrio en los gases, con cavitaciones no letales, 2) un periodo de mortandades rápidas, y 3) un periodo donde los ejemplares, aunque con lesiones, sobreviven hasta que eventualmente, perecen. La aparición de estas burbujas de gas se producía cuando la temperatura del agua bajaba drásticamente, generalmente durante el otoño. Esto limitó la producción de larvas invernantes en el Centro de Cría, ya que éstas debían ser transferidas a la Sala de Adultos para evitar su aparición, acelerando con ello su metamorfosis. A partir del 2013, se consiguió atajar el problema agitando fuertemente la superficie del agua para romper la tensión superficial y dejar salir así el oxígeno (Masser *et al.* 1992), empleando para ello un difusor de agua en la boca del grifo.

II. Experimentación con *R. iberica*

Los resultados obtenidos muestran que para este estadio de desarrollo G36, no existen diferencias significativas entre los distintos grupos (diferente densidad y número de refugios) ni en el peso (P), ni la longitud larvaria (SVL) ni la anchura de la cabeza (HW) (tabla 1). La longitud de la cabeza (HL), único factor de estudio con una distribución no normal, tampoco resultó significativa ($\chi^2= 26.88$, $p= 1.0$):

Tabla 1: Resultados obtenidos del ANOVA donde se analiza el efecto de la densidad larvaria y el número de refugios sobre el peso de la larva (P), longitud larvaria total (SVL) y anchura de la cabeza (HW) en larvas de *R. iberica* en el estadio de Gosner 36.

	P	SVL	HW
Densidad	$F_{1,20}=1.36$, $p=0.25$	$F_{1,20}=0.97$, $p=0.32$	$F_{1,20}=0.9$, $p=0.32$
Refugios	$F_{1,20}=0.78$, $p=0.39$	$F_{1,20}=0.27$, $p=0.60$	$F_{1,20}=0.52$, $p=0.46$
Densidad*Refugios	$F_{1,20}=0.05$, $p=0.82$	$F_{1,20}=4.0$, $p=0.06$	$F_{1,20}=1.64$, $p=0.20$

Así pues, una vez eliminado posibles factores adicionales que pudieran afectar al crecimiento larvario, se procedió al estudio de la densidad como único factor, observándose que ésta afectó al peso larvario, haciendo los ejemplares más pequeños a densidades altas ($t = -2.53$, $df = 465$, $p = 0.012$), no afectando ni a SVL ($t = 0.98$, $df = 465$, $p = 0.32$), ni HW ($t = 1.05$, $df = 465$, $p = 0.31$), ni HL ($U = 28.54$, $p = 0.37$).

En el estadio de Gosner 42, los datos no necesitaron log-transformarse, observándose diferencias significativas en la longitud larvaria total (SVL) para la interacción entre la densidad y la abundancia de refugios (figura 19 y tabla 2).

Tabla 2: Resultados obtenidos del análisis del ANOVA donde se analiza el efecto de la densidad larvaria, el número de refugios y la aplicación de itraconazol sobre el peso (P), longitud larvaria total (SVL) y número de metamórficos al día 46 del inicio del experimento, en las larvas de *R. iberica* en el estadio de Gosner 42.

	P	SVL	Núm. metamórficos
Densidad	$F_{1, 14} = 0.24$, $p = 0.62$	$F_{1, 14} = 0.15$, $p = 0.69$	$F_{1, 14} = 1.36$, $p = 0.26$
Refugios	$F_{1, 14} = 0.11$, $p = 0.74$	$F_{1, 14} = 0.56$, $p = 0.45$	$F_{1, 14} = 3.03$, $p = 0.10$
Densidad*Refugios	$F_{1, 14} = 0.47$, $p = 0.50$	$F_{1, 14} = 17.8$, $p = 0.04^{**}$	$F_{1, 14} = 0.44$, $p = 0.50$
Itraconazol	$F_{1, 14} = 0.88$, $p = 0.36$	$F_{1, 14} = 0.17$, $p = 0.89$	$F_{1, 14} = 1.42$, $p = 0.25$
Itraconazol*Refugios	$F_{1, 14} = 0.47$, $p = 0.49$	$F_{1, 14} = 2.35$, $p = 0.12$	$F_{1, 14} = 0.05$, $p = 0.98$
Itraconazol*Densidad	$F_{1, 14} = 0.7$, $p = 0.41$	$F_{1, 14} = 0.95$, $p = 0.75$	$F_{1, 14} = 4.39$, $p = 0.054$
Itraconazol*Densidad*Refugios	$F_{1, 14} = 0.72$, $p = 0.41$	$F_{1, 14} = 0.54$, $p = 0.46$	$F_{1, 14} = 0.47$, $p = 0.5$

Los resultados del análisis post-hoc muestran que ante la presencia de refugios, la densidad larvaria influye poco en la longitud larvaria total, mientras que cuando no hay refugios, la longitud larvaria total se incrementa a densidades larvarias bajas.

Relación entre la longitud larvaria, la densidad y abundancia de refugios en el estadio G42

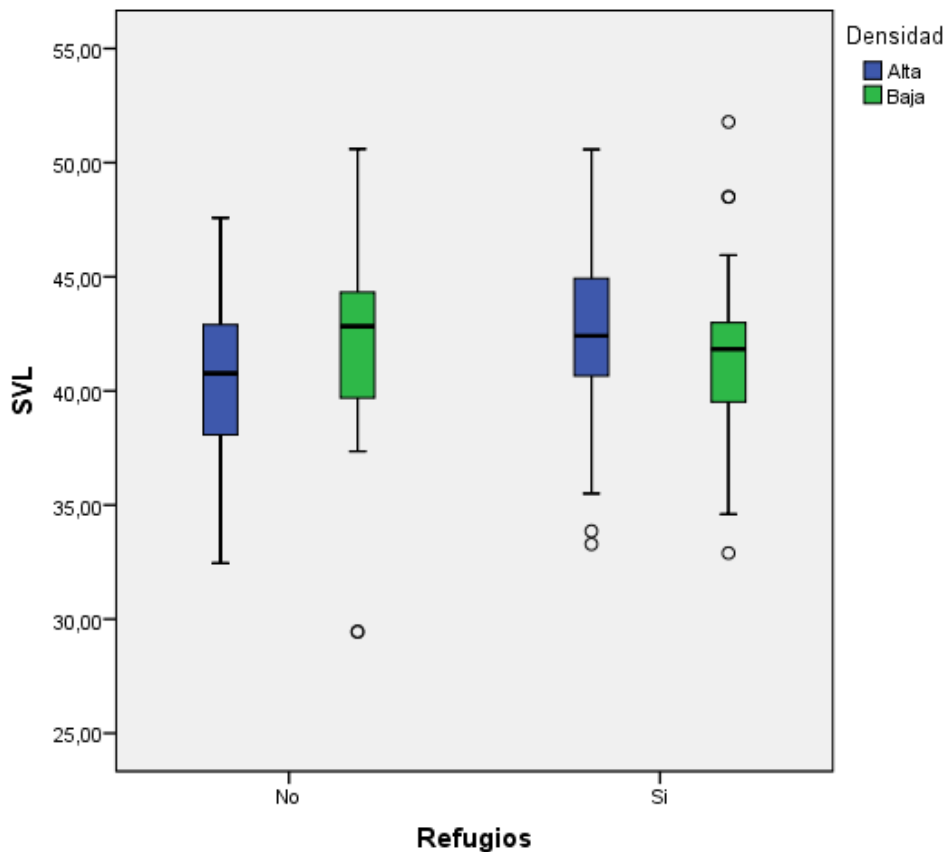


Figura 19: Diagrama de cajas de la relación entre la longitud larvaria total (SVL), y la densidad de larvas y abundancia de refugios en larvas de *R. iberica* en el estadio de Gosner 42.

En el experimento realizado se constató que densidades de cría de 1.35 larvas/litro afectaba al desarrollo larvario, disminuyendo su tamaño, mientras que la presencia de numerosos refugios no tenían una influencia positiva en su crecimiento en el estadio de Gosner 36. Así mismo, la combinación entre refugios y densidad en el estadio de Gosner 42 también influenciaba el crecimiento larvario. De esto se dedujo que la cría de larvas de rana patilarga a densidades menores de 1.35 larvas/litro era ventajoso, sin la necesidad de un medio con numerosos refugios, lo que facilitaría la limpieza y el seguimiento del bienestar larvario. Existe una

bibliografía extensa donde se muestran los beneficios de la cría de larvas de ránidos a densidades bajas, en torno a 1 larva/litro (Wilbur & Collins 1973; Wilbur 1977; Martinez *et al.* 1996; Flores-Nava & Vera-Muñoz 1999), si bien no hay una explicación única de por qué la densidad afecta al crecimiento larvario (Martinez *et al.* 1996). Algunos autores lo relacionan con la competencia por la comida (Wilbur & Collins 1973; Wilbur 1977), y otros lo asocian al estrés producido por encuentros físicos entre larvas (Gromko *et al.* 1973). La comida se mantuvo constante a lo largo del experimento, lo que debería descartar la primera explicación; mientras que la hipótesis sobre las colisiones entre larvas, si realmente afectasen, podrían haber quedado reducidas con la presencia de numerosos refugios. Sin embargo, el número de refugios no afectó al desarrollo larvario. Durante el experimento se observó que las larvas usaban con frecuencia los tubos de PVC, por lo que se descartó que los resultados se debieran a la falta de uso de este espacio. Así, quizá los resultados no fueron significativos porque el número y longitud de los refugios aportados no fuera suficiente como para que hubiera una diferencia real entre ambos grupos.

Otros factores que pueden afectar al desarrollo larvario son el fotoperiodo y la temperatura. El fotoperiodo permaneció constante a lo largo del experimento, y los resultados del ANOVA permitieron descartar la temperatura como una covariable influyente. Otro posible factor que puede influir en el desarrollo larvario es la cantidad de oxígeno disuelto en el agua (Hailey *et al.* 2006); en nuestro caso no fue estudiado ya que todos los acuarios mantuvieron las mismas condiciones de agua y flujo durante todo el experimento.

Como se ha dicho, una mayor tasa de diferenciación conlleva unos costes al individuo. Dichos costes podrían hacerse notables con el tiempo, disminuyendo la probabilidad de supervivencia (Adama *et al.* 2004). Los resultados del experimento demuestran que para la concentración del azol empleada y tiempo de tratamiento, el antifúngico no afectó al tamaño o al tiempo de desarrollo larvario. Si bien en anfibios no está demostrado, en mamíferos se ha comprobado que el itraconazol persiste en los tejidos queratinizados, como por ejemplo en la piel (Pessier & Mendelson 2009). Más aún, algunos azoles disminuyen la síntesis de hormonas esteroideas afectando así a la reproducción, además de generar ocasionalmente úlceras, anorexia, etc. (Pessier & Mendelson 2009). Por tanto, se sabe que el itraconazol puede afectar negativamente a larvas y recién metamórficos. Entonces, ¿por qué no se han observado efectos en rana patilarga? La tolerancia a este azol en muchos anfibios, como en la especie que nos ocupa, es desconocida. Por un lado Pessier & Mendelson (2009) refieren casos de respuestas antagónicas al tratamiento, entre diferentes instalaciones de cría, dentro de una misma especie. Y, al mismo tiempo, quizá el haber escogido dos estadios de desarrollo relativamente próximos no permita

observar efectos negativos o bien que éstos se muestren cuando el anfibio tenga más edad, o su efecto sea notable en el campo.

2) Optimización de la cría y del tamaño de los juveniles

El crecimiento post-metamórfico está estrechamente relacionado con dos tipos de factores: aquéllos que condicionan el desarrollo larvario y, por tanto, el *fitness* del ejemplar post-metamórfico (Altwegg & Reyer 2003), y los que propiamente afectan al ejemplar post-metamórfico (Scott *et al.* 2007). Los primeros han sido discutidos previamente, por lo que no volverán a serlo ahora. En cuanto a los segundos, hay que dividirlos en dos: factores bióticos (*e.g.* densidad, depredación, competencia, etc.) o abióticos (*e.g.* temperatura, humedad ambiente, refugios, etc.) (Cohen & Alford. 1993). En un centro de cría en cautividad, muchos de estos factores se mantienen más o menos estables, como la temperatura o la humedad ambiente; o no existen, como la depredación y, hasta cierto punto, la competencia. Por esta razón, resultaba más interesante, para el desarrollo de un buen manejo en cautividad de ambas especies, estudiar:

- En *A. obstetricans*: optimizar la cría en cautividad de los juveniles en cajas colectivas.
- En *R. iberica*: si la humedad ambiente y si el Itraconazol tenían un efecto tóxico (a largo plazo en el caso de Itraconazol) en la supervivencia juvenil.

Del mismo modo que las larvas poseen una plasticidad fenotípica relacionada con las condiciones ambientales, los juveniles también la poseen. Un desarrollo larvario inadecuado, y, por tanto, un tamaño metamórfico menor al óptimo, puede compensarse con un crecimiento juvenil acelerado (Boone 2005), siendo su coste elevado, y comprometiendo con ello la supervivencia del ejemplar (Abrams *et al.* 1996). En el caso del sapo partero común, la baja mortalidad larvaria hacía suponer que el *fitness* de los ejemplares metamorfoseados, hasta cierto punto, era óptima, por lo que podría descartarse el efecto de un *fitness* larvario inadecuado en el resultado del experimento.

En cuanto a la experimentación llevada a cabo con los juveniles de rana patilarga, esto es, el estudio de la supervivencia en función de la humedad y la toxicidad del itraconazol, la influencia del *fitness* larvario en la supervivencia juvenil es incierta. Por un lado, era patente que el tamaño de los ejemplares recién metamórficos era menor con respecto a los observados en el Macizo de Peñalara (Martín-Beyer, *obs. pers*) y, por otro lado, la duración relativamente corta del experimento (31 días), hacía pensar que su influencia, de haberla, sería mínima y difícilmente cuantificable.

I. Experimentación con *A. obstetricans*

La ganancia de peso media entre ambos grupos (cajas individuales, CI y cajas colectivas, CC) fue similar: $P_{CI} 0.68 \pm 0.31$ gr. y $P_{CC} = 0.75 \pm 0.52$ gr. Aunque se observa una ganancia de peso mayor en CC (figura 20), la desviación de los datos por grupo es elevada, la diferencia es muy pequeña, y no es estadísticamente significativa $Kruskal-Wallis = 77$, $p = 0.3$.

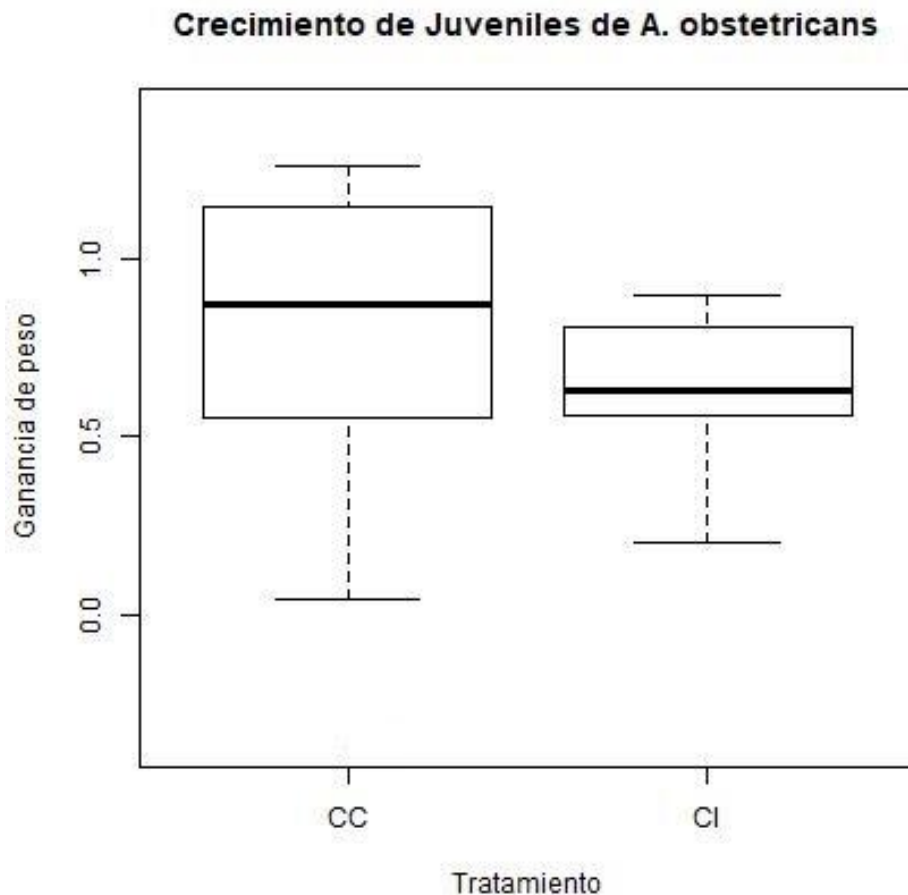


Figura 20: Diagrama de cajas representando los resultados del crecimiento de juveniles de *A. obstetricans* en la Sala de Adultos del Centro de Cría. CC: cajas colectivas, CI: cajas individuales.

Primeramente, hay que tener en cuenta que el número de ejemplares empleado fue muy limitado. Tanto fue así, que no permitió replicar el grupo de cajas colectivas, por lo que los resultados obtenidos y su interpretación deben observarse bajo este prisma.

Los resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos, por lo que se podrían criar en cajas individuales y colectivas indistintamente. Estos datos tenían una aplicación inmediata

en la optimización de la cría en cautividad del sapo partero común, ya que en función de las necesidades del Centro de Cría, los ejemplares se instalarían en unas u otras cajas. Las cajas colectivas tienen la ventaja de permitir poder comprobar el estado físico de los ejemplares más fácilmente que las individuales. Así, se decidió que los recién metamórficos fueran colocados siempre en ellas, para ser reubicados en cajas individuales una vez fueran incorporados a la colonia cautiva.

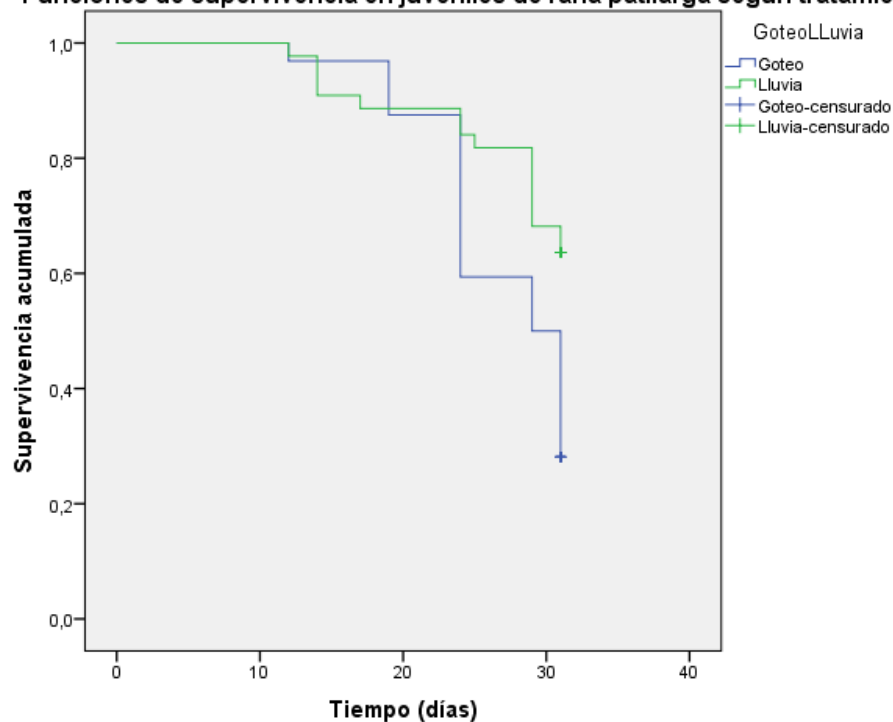
Un dato sorprendente, si bien no fue significativo, fue la mayor ganancia de peso mostrado en el grupo criado en la caja colectiva. Berven (2009) observó que para *L. sylvaticus*, la densidad juvenil estaba inversamente correlacionada con el tamaño adulto, influenciando negativamente la tasa de crecimiento, por lo que era de esperar obtener ejemplares de menor tamaño en la caja colectiva. Pese a que los ejemplares de las cajas individuales eran 0.32 gr de media más pesados que los ejemplares de las cajas colectivas, los ejemplares de la caja colectiva incrementaron su peso un 32%, mientras que los de las cajas individuales lo hicieron un 26%. Una probable explicación sería que los ejemplares metamórficos más grandes tienen tasas de actividad menores (*i.e.* tienen mayores reservas energéticas, por lo que no necesitan buscar comida tan frecuentemente, reduciendo así su posibilidad de ser depredados), lo que disminuiría su tasa de crecimiento (Tarvin *et al.* 2015), aunque en otras especies se ha obtenido el efecto contrario (Altwegg & Reyer 2003). Otra posible explicación, aunque menos probable, es una diferenciación en la tasa de crecimiento en función del sexo, como ha sido observado en ejemplares de *A. muletensis* (Pinya & Pérez-Mellado 2013).

II. Experimentación con *R. iberica*

El análisis de Cox reveló que la probabilidad de los juveniles de perecer en un medio con goteo de agua (GG) era 0.43 más elevada que con lluvia fina (GL) ($\chi^2 = 6.66$, $p = 0.01$). Más aún, sin contar el efecto del Itraconazol, la mortandad en el grupo GG fue de un 73.4%, siendo en el grupo GL del 23.3%. A diferencia de lo esperado, el Itraconazol no tuvo un efecto significativo en la tasa de supervivencia ($\chi^2 = 0.103$, $p = 0.74$).

Si se realiza el análisis de Kaplan-Meier para la supervivencia, excluyendo el tratamiento con Itraconazol como cofactor, vuelve a ser significativo ($\chi^2 = 7.85$, $p = 0.05$), observándose mayor supervivencia en el grupo GL (figura 21).

Funciones de supervivencia en juveniles de rana patilarga según tratamiento



Función de riesgo en rana patilarga en función del tratamiento

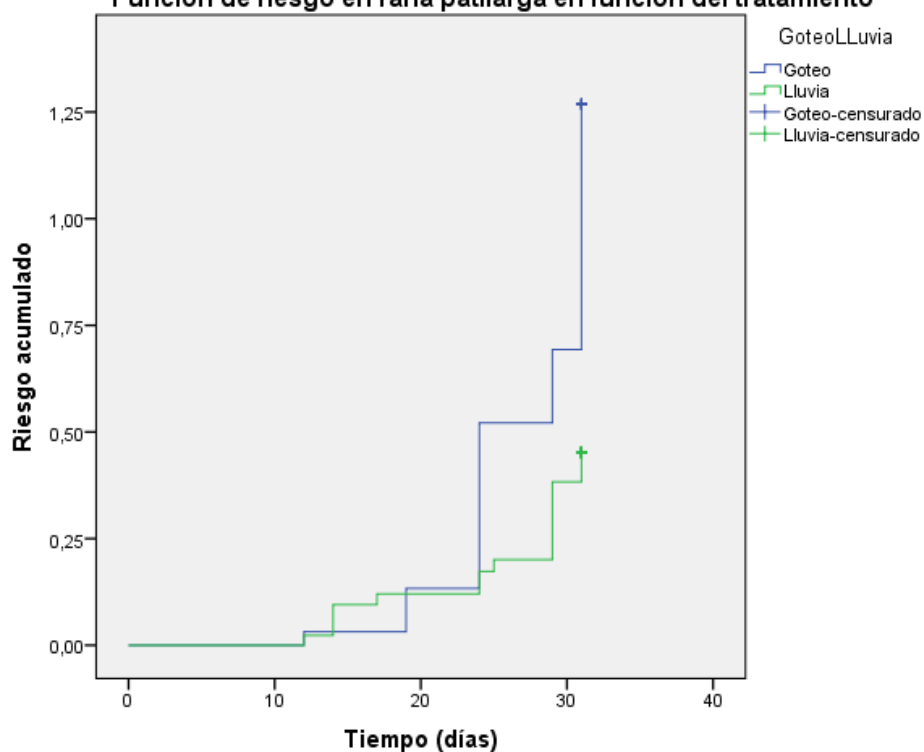


Figura 21: Curva de supervivencia y función de riesgo de la cría de juveniles de *R. iberica* obtenidas tras el análisis de Kaplan-Meier en el experimento entre el grupo goteo de agua y el grupo lluvia fina.

Los resultados obtenidos muestran que con el sistema simulando una lluvia fina, los juveniles tenían una mayor tasa de supervivencia que aquellos expuestos a la aportación diaria en forma de gotas, lo que hizo descartar este último método como condición de cría de *R. iberica* en el Centro de Cría, y demostró que los juveniles debían ser criados en cajas con un sistema de riego, lo cual limitaba la distribución de la rana patilarga en la Sala de Adultos. Esto concuerda con lo observado en el territorio nacional (García-Paris *et al.* 2004) y en el Macizo de Peñalara, donde los recién metamórficos y juveniles se encontraban a menos de 5 metros de la orilla del arroyo (Martín-Beyer *obs. pers.*). Así mismo, concuerda con las altas mortalidades experimentadas al comienzo del programa de cría de la especie, cuando los juveniles se mantuvieron en cajas de tratamiento, sin un sistema de riego añadido. Cohen & Alford (1993) sugirieron que para *Rhinella marina*, Linneo 1758, los recién metamórficos y juveniles permanecían cerca de las masas de agua para evitar la desecación y quizá debido a los cambios fisiológicos experimentados durante las fases finales de la metamorfosis. Así pues, es de suponer que la humedad, en el caso de la rana patilarga, podría ser un factor importante para la supervivencia en cautividad, o, al menos, serlo durante un cierto tiempo. Pero no sólo eso, podría incluso tener algún efecto en la tasa de crecimiento. Por ejemplo Cohen & Alford (1993) constataron un crecimiento ralentizado en los ejemplares de *R. marina* asociado a ambientes secos. Si bien parece poco probable, cabe mencionar que se ha descrito tasas de supervivencia en juveniles de *L. sylvaticus* diferenciales según el sexo, siendo superiores para esta especie en machos (Berven 2009).

En relación al Itraconazol, su estudio en rana patilarga es importante porque se ha observado que ésta es un hospedador potencial de *Bd* (Fernández-Beaskoetxea *et al.* 2016), y existen pocos estudios que analicen su posible efecto negativo a largo plazo en anfibios. Nuestra experimentación demuestra que para la concentración de Itraconazol estudiada, no hay un efecto negativo en la supervivencia de juveniles ni en el crecimiento larvario. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el experimento realizado duró 31 días, y que, de haberlos, podrían observarse mucho más tarde, por ejemplo durante la reproducción (Pessier & Mendelson 2009). Hardy *et al.* (2015) observaron una pérdida de peso significativa tres semanas después del tratamiento aplicado a juveniles de *R. cascadae*, si bien emplearon concentraciones de 0.01%, muy superiores a las empleadas en nuestro experimento. Obviamente, la concentración de Itraconazol es uno de los factores involucrados en la sensibilidad al azol, pero posiblemente haya un factor específico o incluso poblacional involucrado en la tolerancia (Pessier & Mendelson 2009). Si bien en anfibios no se ha demostrado, en mamíferos se ha constatado que el Itraconazol persiste en tejidos queratinizados semanas después de los tratamientos (Pessier & Mendelson 2009). Si esto así ocurriera, el efecto podría observarse mucho más tarde, aunque

Hardy *et al.* (2015) creen que la persistencia de este azol en la piel no sería muy larga, ya que a diferencia de los mamíferos, la piel de los anfibios es muy fina. El Itraconazol, además, se ha asociado a una disminución de la tasa de crecimiento (Woodhams *et al.* 2012; Hardy *et al.* 2015), lo que, como hemos visto, podría comprometer la supervivencia de los anfibios. Así, quizá se pudo estudiar la influencia del Itraconazol en las tasas de crecimiento en el experimento, pero la altísima sensibilidad de *R. iberica* a cualquier manipulación desaconsejó su estudio.

PRODUCCIÓN DE EJEMPLARES EN CAUTIVIDAD

La primera cuestión que podría llamar la atención es la ausencia de cría en cautividad de la rana patilarga. La producción de ejemplares en cautiverio con fines conservacionistas debería realizarse en poblaciones donde los adultos tienen una capacidad reproductora muy limitada (Semlitsch 2002), y esta situación se daba con el sapo partero común, no así en la rana patilarga, la cual tenía una población relativamente estable en la Hoya de Pepe Hernando. Además, el Centro de Cría cuenta con un espacio reducido, que probablemente hubiera hecho inviable reproducir dos especies a la vez, además de que el esfuerzo invertido se hubiera duplicado.

La cría en cautividad comporta una serie de desventajas relacionadas con la pérdida de variabilidad genética por el aumento de la endogamia y la disminución de la exogamia, y que además puede aparecer en una generación (Christie *et al.* 2012). Adicionalmente, hay que añadir la selección sexual “relajada” (*i.e.* disminución de la competencia entre ejemplares debido a la domesticación) y que muchas veces pasa inadvertida. Así, estos problemas pueden detectarse en poblaciones naturales estudiando componentes de la eficacia biológica como son el peso al nacer, la supervivencia larvaria y juvenil o el éxito reproductivo (Gomendio *et al.* 2006).

Las medidas adoptadas para paliar estos efectos fueron:

1. Separación de la colonia cautiva en varios grupos (Williams & Hoffman 2009).
2. Mezcla de los núcleos poblacionales entre sí antes de las liberaciones (previo análisis genético de la población (Albert *et al.* 2015)).
3. Simulación del medio natural del Macizo de Peñalara, ayudando así a desarrollar comportamientos semejantes a los observados en la naturaleza (Williams & Hoffman 2009).

En condiciones de no cautividad, se ha observado que en algunas especies, las hembras pueden, en función de las condiciones ambientales, optar entre dos estrategias: maximizar la fecundidad (*i.e.* a través del número de huevos) o aumentar el *fitness* de la descendencia (*i.e.* mediante el tamaño del huevo) (Berven 2009). Así, en periodos de alta densidad poblacional, las hembras producirían huevos más pequeños, mientras que cuando la densidad fuera baja, producirían huevos de mayor tamaño (Berven 2009). Si bien en *A. obstetricans* no está demostrada esta adaptabilidad, esto no implica que las hembras no puedan, de alguna forma, responder diferencialmente a las condiciones ambientales, lo que, por otro lado, tiene su lógica dada la plasticidad ambiental mostrada en larvas y juveniles. Así, se hace necesario conocer en profundidad la colonia cautiva y sus necesidades para optimizar la producción de individuos.

I. Discriminación sexual en *A. obstetricans*

El resumen de los datos se muestra en la tabla 3. La función discriminante, cuyo punto de corte es 1.95, es la siguiente:

- Hembras= $1.56 \times \text{SVL} - 0.18 \times \text{JL} - 0.22 \times \text{HW} - 0.17 \times \text{ED} - 0.51 \times \text{ND} - 0.18 \times \text{HT} - 0.43 \times \text{VT} - 0.35 \times \text{HLL} - 0.28 \times \text{FTL} - 0.15 \times \text{TFL} - 0.39 \times \text{TL}$.
- Machos= $1.55 \times \text{SVL} - 0.31 \times \text{JL} - 0.33 \times \text{HW} - 0.31 \times \text{ED} - 0.23 \times \text{ND} - 0.64 \times \text{HT} - 0.20 \times \text{VT} - 0.19 \times \text{HLL} - 0.32 \times \text{FTL} - 0.21 \times \text{TFL} - 0.29 \times \text{TL}$.

Tras aplicar la función discriminante, se asignó correctamente a las hembras en el 80% de los casos, y a los machos en el 75%. El análisis de U de Mann-Whitney de los datos no revela diferencias significativas en ninguna de las medidas analizadas (tabla 3).

Tabla 3: Tabla descriptiva de las medidas morfológicas obtenidas por sexos en *A. obstetricans* (ver la figura 12 para la descripción de las variables morfológicas) y los valores de probabilidad (*p*) según el test de la U de Mann-Whitney para la comparación entre sexos.

Variable	Sexo	N	Media	SD	Mínimo	Máximo	P
SVL	Macho	4	37.32	3.30	34.03	40.56	0.90
	Hembra	5	35.88	1.47	34.41	38.36	
HW	Macho	4	12.49	2.01	10.66	14.48	0.90
	Hembra	5	11.86	0.62	11.33	12.83	
JL	Macho	4	12.57	1.68	11.13	14.41	0.90
	Hembra	5	13.18	3.43	9.81	18.90	
ED	Macho	4	3.09	0.47	2.65	3.50	0.73
	Hembra	5	2.98	0.29	2.73	3.43	
HT	Macho	4	5.55	0.07	5.46	5.65	0.56
	Hembra	5	5.45	0.62	4.81	6.50	
VT	Macho	4	2.49	0.11	2.40	2.65	0.73
	Hembra	5	2.64	0.41	2.01	3.01	
ND	Macho	4	3.50	0.19	3.40	3.80	0.73
	Hembra	5	3.35	0.27	2.91	3.66	
END	Macho	4	3.49	0.72	2.4	3.90	0.55
	Hembra	5	3.52	0.25	3.26	3.90	
TFL	Macho	4	13.83	0.89	13.31	15.18	0.73
	Hembra	5	13.81	1.96	11.50	16.51	
HLL	Macho	4	42.82	1.18	41.31	44.20	0.28
	Hembra	5	42.21	2.77	38.45	45.20	
TL	Macho	4	13.07	4.94	8.43	17.45	0.72
	Hembra	5	11.69	6.89	4.88	19.53	
FTL	Macho	4	18.25	1.48	17.00	20.35	0.73
	Hembra	5	18.38	1.38	16.21	19.50	
EFD	Macho	4	5.55	0.07	5.46	5.65	0.55
	Hembra	5	5.45	0.62	4.81	6.50	

Los resultados y sus conclusiones, obtenidas de un grupo tan pequeño, deben ser considerados en su justa medida. En primer lugar, porque una de las variables no alcanzó, una vez log-transformadas, los requerimientos de normalidad multivariante. Si bien el análisis es robusto frente a violaciones de normalidad, sí es más sensible cuando el tamaño de la muestra es pequeño (Tabachnick & Fidell 2001). Aunque la regresión logística responde a las mismas respuestas que el análisis discriminante y no requiere de la distribución normal de los datos, el porcentaje de objetos erróneamente clasificados es similar para la regresión logística y el análisis discriminante, y si hay diferencia, suele estar sobreestimada (Pohar *et al.* 2004). Además, al no hacer asunciones sobre los datos, para muestras pequeñas, la regresión logística es menos robusta (Pohar *et al.* 2004). Así, aunque fuera más lógico emplear la regresión logística, debido al bajísimo número de datos, se consideró el empleo del análisis discriminante como la herramienta más idónea. En segundo lugar, porque a diferencia del trabajo previo sobre la especie en el Macizo de Peñalara (Bosch & Márquez 1996), donde numerosas medidas diferían entre ambos sexos, los resultados no muestran diferencias significativas. El tamaño de los ejemplares capturados y analizados en el trabajo de Bosch & Márquez (1996) eran entre 10 y 15 mm más grandes que los ejemplares medidos de la colonia cautiva. Así, quizá la toma de medidas se hizo en ejemplares que no habían alcanzado su tamaño final, lo que no permitió observar diferencias, y lo que rechazaría la suposición lanzada durante la discusión del crecimiento juvenil, acerca de tasas de crecimiento diferenciadas en función del sexo. En *A. muletensis*, Pinya & Pérez-Mellado (2013) comprobaron que las hembras alcanzaban la madurez antes que los machos, relacionándolo con una probable diferencia en las tasas de crecimiento. En el Centro de Cría no fue posible comprobar esto, ya que se desconocía el sexo de la mayoría de los ejemplares. Los únicos datos disponibles son los del crecimiento tomado a 20 ejemplares durante aproximadamente 9 meses, en los que crecieron una media de 50.53 ± 2.35 mm, aunque las cajas donde se criaron los ejemplares podrían no cumplir completamente los requerimientos de los juveniles, retrasando de alguna manera su crecimiento y, por tanto, no siendo un valor de referencia de la tasa de crecimiento óptima en un centro de cría.

Con respecto a la función discriminante obtenida, ha permitido un 77% total de acierto en la clasificación. Este valor se ha considerado correcto, ya que se ha estimado razonable aceptar como válido aquel que es un 25% superior al que se obtendría clasificando de forma correcta individuos al azar, esto es un 62.5%.

II. Hibernación

Siete ejemplares del grupo que hibernó bajo condiciones controladas (HC) murieron por circunstancias desconocidas durante la hibernación, mientras que otros siete fueron sacados prematuramente, uno de ellos con una evaginación intestinal. En el grupo con hibernación natural (HN), 17 ejemplares sucumbieron a la hibernación. Ningún ejemplar murió en el grupo del acuaterrario (A), si bien un ejemplar tuvo que ser aislado al aparecer muy delgado. Así, entre los 11 ejemplares del grupo HC empleados para la reproducción, no se identificaron hembras grávidas, y ninguna puesta fue observada. En cambio, en el grupo HN se obtuvieron 5 puestas, y 4 en el grupo A, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis=2, $p=0.37$).

Si tomamos las diferencias intragrupalas entre vivos y muertos, se observa que el peso inicial entre ejemplares muertos en HC fue $4.06 \text{ gr} \pm 0.96 \text{ gr}$, mientras que entre los que finalizaron la hibernación fue $7.23 \text{ gr} \pm 3.09 \text{ gr}$. En el caso de HN, los ejemplares vivos pesaron de media $8.79 \pm 3.32 \text{ gr}$, mientras que los ejemplares muertos pesaron $4.44 \pm 0.99 \text{ gr}$. Los valores medios y la varianza de los pesos iniciales en estos dos niveles del factor fueron muy similares, si bien es cierto que la varianza es alta. Esta varianza alta es la que al hacer un análisis más en detalle, refleja la diferencia de pesos entre los muertos y los supervivientes (figura 22) ($F_{48} = -30.96$, $p < 0.005$). Es cierto que lo ideal es que los 80 individuos al inicio del experimento hubiesen pesado lo mismo, es decir que la varianza fuese muy pequeña, pero cada ejemplar crece a su manera y no se disponía de suficientes individuos como para conseguir esta homogeneización inicial en los pesos.

Relación entre Peso inicial y la supervivencia a la hibernación en el sapo partero común

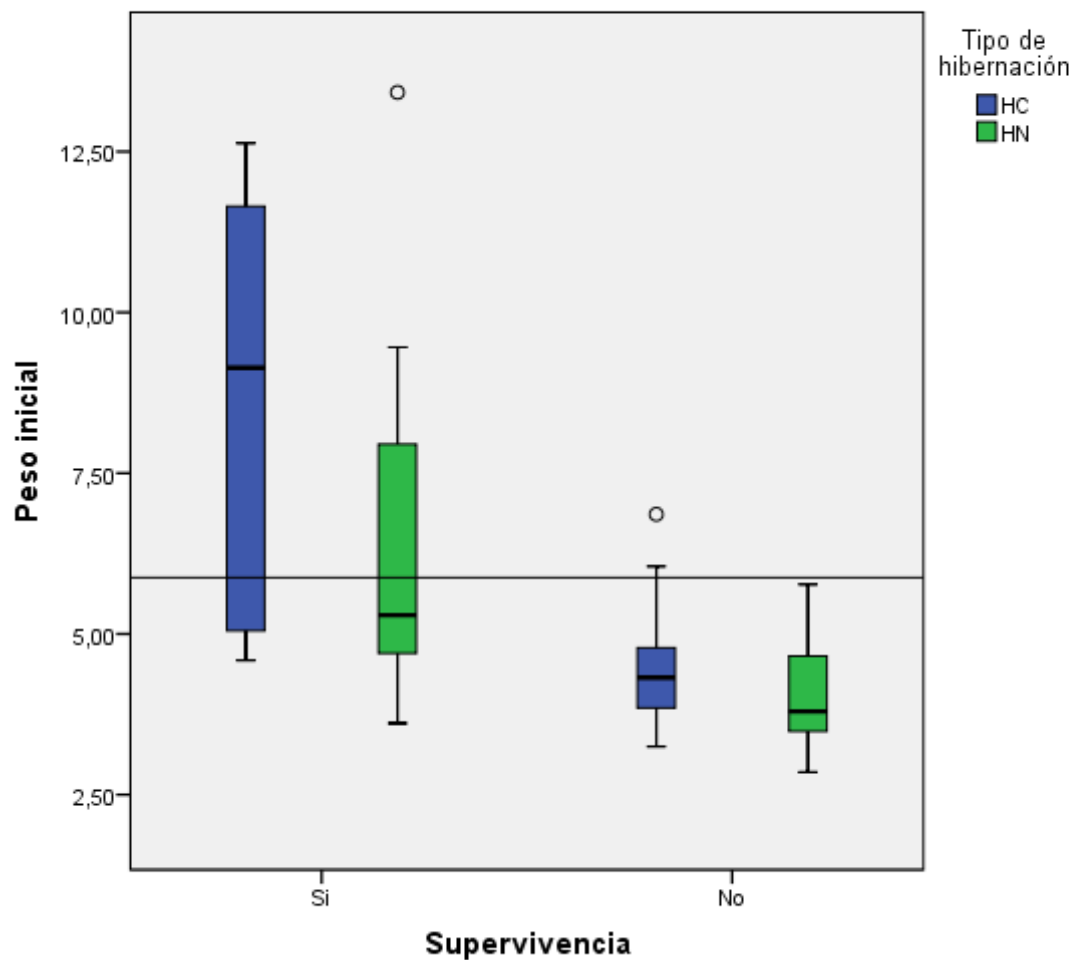


Figura 22: Relación entre la supervivencia a la hibernación y el peso inicial en adultos de *A. obstetricans* durante el experimento de hibernación en las instalaciones del Centro de Cría. La línea marca la media del peso de los individuos empleados en el experimento. HN= hibernación natural, HC=hibernación controlada.

De los resultados obtenidos pueden extrapolarse varias conclusiones:

1. La población de *A. obstetricans* del Macizo de Peñalara no requiere de un periodo de hibernación para la estimulación sexual.
2. El peso previo a la hibernación podría estar relacionado con la supervivencia, penalizando a los ejemplares más pequeños, lo cual tendría implicaciones importantes en los procesos de liberación de ejemplares en el Macizo.

3. Los individuos necesitaron entre dos y tres años para alcanzar la madurez, lo que, en el caso de proyectos de conservación, requiere una organización y previsión rigurosa.
4. El enriquecimiento ambiental pareció influenciar positivamente la producción de ejemplares, confirmándose así su importancia en poblaciones cautivas.

La temperatura es un factor responsable, en numerosas especies, de la diferenciación gonadal (Paniagua *et al.* 1990; Saidapur & Hoque 1995; Rastogi *et al.* 2011; Phuge 2017). Dentro del género *Alytes*, y en condiciones de libertad, se han observado dos tendencias: aquellas especies cuyo periodo reproductor depende, principalmente, de la temperatura, y los que dependen del hidroperiodo (Michaels *et al.* 2016). Podría sorprender que a pesar de que el Macizo de Peñalara es una zona de alta montaña, los ejemplares no precisaron de un periodo de hibernación, pero existen poblaciones a menor altitud que no hibernan y se reproducen de manera continua a lo largo del año, debido a que el sapo partero común tiene un ciclo espermático y ovárico continuo (García-Paris *et al.* 2004). Sin embargo, existía un periodo en el acuaterrario en el que los adultos no se reproducían (de noviembre a febrero aproximadamente), lo que sugiere la existencia de otros factores que inducen el desarrollo gonadal. Uno de ellos podría ser la humedad ambiente (Michaels *et al.* 2016). Si bien no se tomaron medidas sobre esta variable, probablemente ésta se mantuvo más o menos estable durante el año, lo que debería descartar su efecto. Otro factor podría ser el fotoperiodo, y aunque no se haya contrastado, parece ser el mejor situado para explicar los resultados. El fotoperiodo parece afectar a la actividad circadiana de los anfibios (Both *et al.* 2008), aunque su efecto en el desarrollo gonadal no está claro (Paniagua *et al.* 1990; Rastogi *et al.* 2011), sugiriéndose que sería vía la glándula pineal. Dicha glándula, en anfibios, se ha asociado a una función foto y termo-receptora, pudiendo regular, vía melatonina, la diferenciación gonadal (Saidapur & Hoque 1995).

El hecho de que la población del Macizo de Peñalara no requiera de un periodo de hibernación para reproducirse, podría jugar un papel clave en la gestión del Centro de Cría. Primero, porque acorde a los resultados, la hibernación puede conllevar la muerte de los ejemplares cautivos, lo que supone un serio revés en la producción. Segundo, porque de ser necesario hibernar a los individuos (*e.g.* por necesidades de espacio, reformas, etc.), la hibernación controlada parece ser la mejor de las soluciones, ya que perecieron 8 frente a los 17 ejemplares de la hibernación natural. Aunque se ha sugerido que la tolerancia a la hibernación podría depender de la calidad del refugio y la cantidad de comida disponible (Berven 2009), la colonia cautiva dispuso de comida abundante todo el año, y las cajas de hibernación usadas, habían sido empleadas numerosas veces en el Zoo de Durrell (García, *com. pers.*) y se habían utilizado previamente en el Centro de Cría. Por ello, quizá fuera el peso el que jugó un papel clave en la supervivencia

durante la hibernación. Esto concordaría con estudios previos donde, durante la hibernación, se producen gran cantidad de muertes, y donde el tamaño previo a la hibernación parece condicionar la supervivencia (Berven 2009). Además, la razón por la que en el ensayo previo tan sólo pereció un ejemplar, probablemente se debiera al peso inicial de los ejemplares hibernados, con una media de 8.43 ± 1.98 gr, lo que pasó inadvertido a la hora del experimento realizado. Así, para *A. obstetricans*, un peso de al menos cinco o seis gramos, podría asegurar la supervivencia durante la hibernación lo que condiciona las liberaciones en el Macizo, limitándolas a los ejemplares de cierta talla mínima.

Con respecto a las puestas obtenidas durante el experimento, el 37% de ellas fueron encontradas en el suelo, posiblemente debido a que los machos no fueron capaces de enrollarlas correctamente entre sus patas. Éstas contenían una media de 27 huevos con un diámetro 0.34 ± 0.04 mm. Estos valores son similares a los reportados en otros centros de cría (Michaels *et al.* 2016). Se trató por todos los medios de obtener larvas de dichas puestas, bien empleando un sustrato de coco y manteniéndolas hidratadas y en oscuridad, o bien en un sustrato de vermiculita con un tratamiento antibiótico, pero desgraciadamente no se consiguió. ¿Pudo haber influenciado en los resultados obtenidos *Bd*? Poco se sabe sobre cómo una infección puede afectar a la reproducción en los anfibios (Brannelly *et al.* 2016b). Se ha reportado casos de poblaciones que aumentaban su inversión en reproducción (*i.e.* aumentando la gametogénesis) como respuesta frente a la infección por *Bd* (Chatfield *et al.* 2013; Brannelly *et al.* 2016b). Para los resultados presentados en esta Tesis, no se estima que *Bd* haya influido. El tratamiento en la Sala de Adultos con temperaturas moderadas mantuvo ejemplares provenientes de un entorno *Bd* positivo (donde todas las larvas empleadas para numerosos experimentos estaban infectadas), sin infecciones meses después de metamorfosearse (datos no publicados). Más aún, análisis posteriores en adultos provenientes de estos entornos, y criados desde larvas en las instalaciones del Centro de Cría, revelaron que seguían sin estar infectados.

Desconocer el sexo de los ejemplares del Centro de Cría supuso un lastre ya que el fracaso en la cría dentro de las instalaciones (*i.e.* en las cajas de adultos de la Sala de Adultos) pudo deberse a la ausencia de machos/hembras grávidas o a la falta de espacio, todas ellas hipótesis que no pudieron ser comprobadas. En la zona vallada fuera de las instalaciones del Centro, y donde se realizó la hibernación natural, los ejemplares apenas fueron alimentados con grillos producidos en la Sala de Alimento Vivo, ya que se observaron numerosos invertebrados en el recinto. Una alimentación más variada y natural se ha asociado a comportamientos más naturales (D. García, *com. pers.*). Este régimen de cría en semi-cautividad comporta implícitamente un cierto riesgo

de depredación y exposición a inclemencias meteorológicas, pero en los años en los que se empleó (2011 y 2012), no se registraron muertes y, de aquí su gran valor, requiere una baja inversión de recursos humanos, lo que sugiere su idoneidad como lugar de cría durante los meses cálidos del verano.

DESARROLLO DE UN TRATAMIENTO *IN SITU* EFECTIVO FRENTE A LA QUITRIDIOMICOSIS

Se observa en *A. obstetricans* una relación estadísticamente significativa en la eliminación de la infección en función de los tratamientos (Kruskal-Wallis= 5.97, $p= 0.05$). El análisis post-hoc con el test de Dunn, revela que sólo el Itraconazol varió significativamente con respecto al control (tabla 4), no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre el resto de grupos.

El tratamiento de 0.0001% de Itraconazol no consiguió eliminar la infección en el 100% de los ejemplares tratados. De las 18 larvas que completaron el tratamiento (con un 90% de supervivencia), dos permanecieron infectadas, aunque la concentración final de *Bd* había disminuido a más de la mitad. En el tratamiento con la temperatura, el 55% de los ejemplares permanecieron infectados, si bien todos completaron el tratamiento. Del grupo control, se observó una pérdida espontánea de la infección en el 63% de los casos.

Tabla 4: Resultados del análisis post-hoc de Dunn obtenido en el experimento *in situ* sobre el estudio de la efectividad del tratamiento con Itraconazol (ITZ) y con temperaturas elevadas (T) frente a la infección de *Bd* en *A. obstetricans*. C: Grupo Control.

Tratamiento	C	ITZ
ITZ	-2.14	-
	$p=0.01^{**}$	
T	-1.15	0.94
	$p=0.12$	$p=0.17$

La quitridiomycosis y su tratamiento *in situ* suponen un gran reto en la cría en cautividad (Brannelly *et al.* 2012). Dichos tratamientos se basan en el conocimiento que se tiene sobre la

fisiología y la ecología de *Bd* (Woodhams *et al.* 2012), lo cual ha permitido orientar la investigación hacia métodos concretos, como los antifúngicos, tratamientos con temperaturas elevadas o los péptidos.

Como se ha comentado previamente, no existe un tratamiento único, sino que un mismo compuesto afecta de manera diferente según la especie y, en ocasiones, incluso según la población (Pessier & Mendelson 2009). Dicha diferencia puede deberse a la virulencia de las diferentes cepas de *Bd*. Así, la cepa de Cape (*BdCAPE*), responsable del declive en *A. muletensis* por ejemplo, es poco resistente frente al Itraconazol, mientras que la cepa *BdGPL*, responsable del declive en el Macizo de Peñalara, es muy virulenta y además resistente (Farrer *et al.* 2011). Más aún, en condiciones de laboratorio, se ha comprobado que existe una mortalidad diferencial según la población, observándose rangos de entre 27-90% (Tobler & Schmidt 2010), proponiéndose la genética como factor probablemente responsable de dichas diferencias.

El tratamiento desarrollado con Itraconazol se ha mostrado efectivo en el 89% de los ejemplares tratados, siendo ésta mayor que el tratamiento térmico, donde sólo el 45% de los ejemplares perdieron la infección. De los resultados puede criticarse, y con lógica, que no se empleara un control específico para el tratamiento térmico, y que en consecuencia, no se pueda analizar su eficacia real. Máxime cuando en otras especies el tratamiento con temperaturas elevadas ha sido efectivo (Woodhams *et al.* 2003; Chatfield & Richards-Zawacki 2011). Sin embargo, hay que tener en cuenta la disponibilidad limitada de ejemplares para la experimentación, y que el tratamiento con Itraconazol y el tratamiento con temperatura variaban exclusivamente en la localización de los ejemplares durante los tratamientos (en el baño maría en la Sala de Adultos o en la Sala de Larvas), ya que en ambos casos el agua se cambiaba diariamente. De hecho, posiblemente este cambio diario de agua fuera el responsable de la pérdida espontánea de infección observada en el grupo control (Kilpatrick *et al.* 2010). Si bien el tratamiento con Itraconazol no es del todo efectivo, tiene ciertas ventajas prácticas en el manejo en cautividad: no requieren mucho tiempo (siete días), se obtiene fácilmente en farmacias y la inversión económica, para esta concentración, es baja. Se ha experimentado, en *A. obstetricans*, con mayores concentraciones de Itraconazol, e incluso, en combinación con otros antifúngicos, pero los resultados (altas tasas de muerte y moderadas tasas de éxito) desaconsejan su uso (Fernández-Loras, *com. pers*). El empleo de mayores concentraciones de Itraconazol se ha asociado con la despigmentación de la piel de las larvas (Garner *et al.* 2009), y con la pérdida de apetito y menores tasas de supervivencia en juveniles (Brannelly *et al.* 2012). En el experimento llevado a cabo, posiblemente debido a la baja dosis empleada, no se observaron lesiones en la piel, y el comportamiento larvario tras el tratamiento fue normal. Las razones de la sensibilidad

de algunas especies al Itraconazol, y si el tratamiento tuvo algún efecto a largo plazo en los animales tratados, son preguntas que no se pueden responder actualmente.

Dada la susceptibilidad de *Bd* frente a la temperatura, parecía lógico pensar que un tratamiento térmico a temperaturas elevadas podría ser efectivo. Al igual que ha ocurrido con el Itraconazol, existen resultados encontrados. Algunos han conseguido eliminar la infección (Woodhams *et al.* 2003; Chatfield & Richards-Zawacki 2011), mientras que otros no han sido efectivos (Woodhams *et al.* 2012), lo que sugiere que esta línea de tratamiento debe ser estudiada en profundidad, especialmente debido al estrés al que puede verse sometido el animal tratado, ya que temperaturas elevadas pueden resultar lesivas para especies cuyos rangos de tolerancia térmica sean limitados (Brannelly *et al.* 2012). Las larvas, en el experimento sobre la eficacia de la temperatura a 30 °C como tratamiento frente a *Bd*, se metamorfosearon antes que el grupo control y el grupo Itraconazol, lo que, como ya se ha visto, es un síntoma inequívoco de un ambiente poco propicio (debido a que no era el objetivo del experimento, no se tienen datos precisos a este respecto, por lo que no se han incluido en los resultados). Más aún, si la temperatura, como se ha visto, está implicada en la gametogénesis, debería estudiarse su efecto en los huevos y la calidad gamética, por si tuviera algún efecto negativo en los adultos de sapo partero común (Woodhams *et al.* 2012).

En *A. obstetricans* se han empleado otros antifúngicos con un resultado negativo, como es el caso de Pip Pond Plus, Steriplant N y la mandipropamida (Woodhams *et al.* 2012). Esto demuestra la dificultad de desarrollar un método de tratamiento único para la especie. Quizá, una combinación de varios tratamientos dé como resultado la eliminación total de *Bd* en animales infectados. En el caso de la población cautiva del Centro de Cría, quizá concentraciones bajas de Itraconazol, combinado con un tratamiento térmico moderado como el que se da en la Sala de Adultos, sean suficiente para mantener una colonia cautiva libre de *Bd*.

REINTRODUCCIÓN DE LOS EJEMPLARES PRODUCIDOS Y CONFIRMACIÓN DE SU VIABILIDAD

Los programas de conservación, como en el que se haya embebido esta Tesis, están vinculados a la protección y restauración del hábitat (Carter *et al.* 2017), lo que tiene un beneficio adicional en el estatus de otras especies amenazadas (Simón *et al.* 2012). Sin embargo, cuando las medidas *in situ* no alcanzan las metas conservacionistas, los programas de cría *ex situ* y la

evaluación de los ejemplares producidos en él, se vuelven activos valiosos (Keulartz 2015). Dicha valoración se realiza a través de:

1. El éxito en la supervivencia de los individuos reintroducidos, que está relacionado con el *fitness* de los ejemplares producidos (Batson *et al.* 2015; Willoughby *et al.* 2017). Así, es importante, por un lado, desarrollar un programa de cría en cautividad óptimo (que ha sido discutido a lo largo de las secciones anteriores y que no volverá a serlo ahora) y, por otro, considerar cuidadosamente la población donadora (Brannelly *et al.* 2016a).
2. El establecimiento de poblaciones permanentes en las zonas de reintroducción, que depende del hábitat elegido para la misma y del número de animales reintroducidos (Batson *et al.* 2015).

Reintroducción de *A. osbtetricans*

Se reintrodujeron en la Laguna Chica un total de 451 individuos (tabla 5 y figura 23), de los que el 70% en el año 2012 pertenecían a ejemplares producidos en el Centro de Cría. En total se han recapturado 29 ejemplares (tabla 5) en la Laguna Chica, dos de los cuales dieron positivo en *Bd*. Algunos de los ejemplares recapturados habían sobrevivido a la hibernación, si bien no pudieron ser identificados individualmente debido a que el patrón de colores de los elastómeros no fue visible, y los patrones de coloración del dorso no se apreciaban. Esto ha impedido hacer estudios de captura y recaptura y, por tanto, los datos de ejemplares capturados pueden estar sobreestimados.

En 2011, se escucharon cinco machos cantando a la vez, dos de los cuales pudieron ser localizados acarreado puestas. Una de las muestras contenía, al menos, 21 huevos, y dio negativo frente a *Bd*. Las prospecciones con posterioridad en la Laguna Chica, donde se capturaron larvas, demostraron que, al menos, una puesta había podido ser depositada en el agua. Por desgracia, no se encontraron recién metamórficos en visitas posteriores. Estos datos revelan que los ejemplares criados en cautividad son viables para su reintroducción, si bien el mantenimiento de una población estable no ha sido posible.

Tabla 5: Relación de ejemplares de *A. obstetricans* liberados por año y zona en el Macizo de Peñalara. Entre paréntesis, ejemplares recapturados. Ver figura 2 para la localización de cada punto de liberación.

	Laguna Chica	Pájaros	Cotos	Los llanos
2008	50	17	-	-
2009	150 (22)	26	100 (9)	-
2012	57 (7)		9	44
<u>Total</u>	257	43	109	44

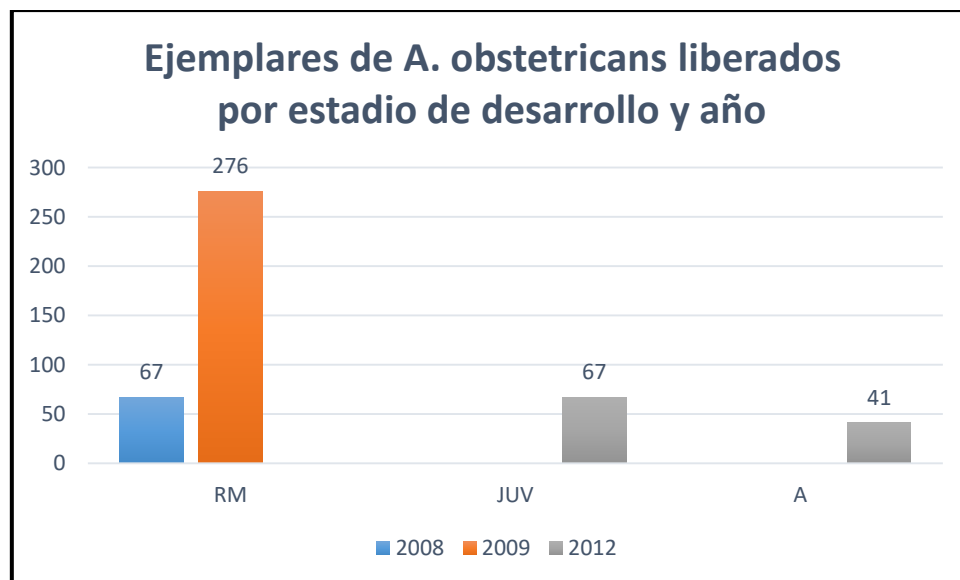


Figura 23: Relación de ejemplares de *A. obstetricans* liberados por año y estadio de desarrollo. RM= recién metamórficos, JUV= juveniles, A= adultos. Puede observarse el cambio de estrategia en las liberaciones, pasando de liberar recién metamórficos a juveniles y adultos.

Las reintroducciones del 2008 se realizaron a mediados de septiembre, cuando el tiempo empezaba a ser frío, por lo que no se tienen resultados de recaptura debido a la ausencia de actividad de los sapos parteros comunes.

Durante el periodo 2010-2011, no se liberaron ejemplares de sapo partero común ya que la estrategia adoptada fue liberar ejemplares adultos criados en cautividad, con una mayor

probabilidad de supervivencia *a priori*. El seguimiento durante ambos años permitió recapturar un total de 6 ejemplares en Laguna Chica y un ejemplar en Cotos. En la Laguna Grande se oyó cantar un macho por primera vez desde que desapareciera el sapo partero común de este enclave. Desafortunadamente el ejemplar no se pudo capturar con lo que se desconoce su procedencia.

Reintroducción de *R. iberica*

Selección de hábitat

La figura 24 muestra la preferencia de hábitats en función del estadio de desarrollo de los ejemplares de la rana patilarga en el arroyo de Pepe Hernando. Salvo los juveniles, tanto los adultos, como las larvas fueron encontrados en pozas, llegando a concentrar un 75% de las observaciones (figura 25). Todos los ejemplares observados fueron hallados a menos de un metro del arroyo, no habiendo una diferencia significativa en la proporción de unidades morfológicas fluviales del arroyo (Kruskal-Wallis=4, $p=0.4$). Así mismo, no se observaron diferencias significativas en la proporción de unidades morfológicas fluviales entre el Arroyo de Pepe Hernando y el Arroyo de Peñalara (Kruskal-Wallis=8.2, $p=0.08$) y Dos Hermanas (Kruskal-Wallis=8.7, $p=0.67$).

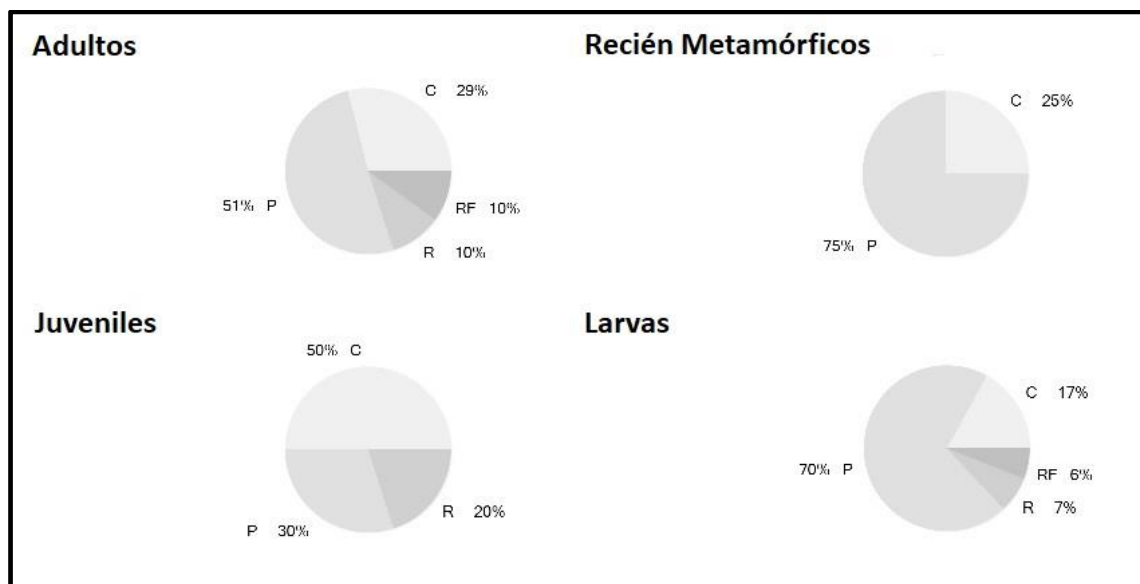


Figura 24: Distribución de los diferentes estadios de *R. iberica* en función de las unidades morfológicas fluviales en el arroyo de Pepe Hernando durante las visitas realizadas. P: poza de caída, C: cascada, R: run, RF: corriente.

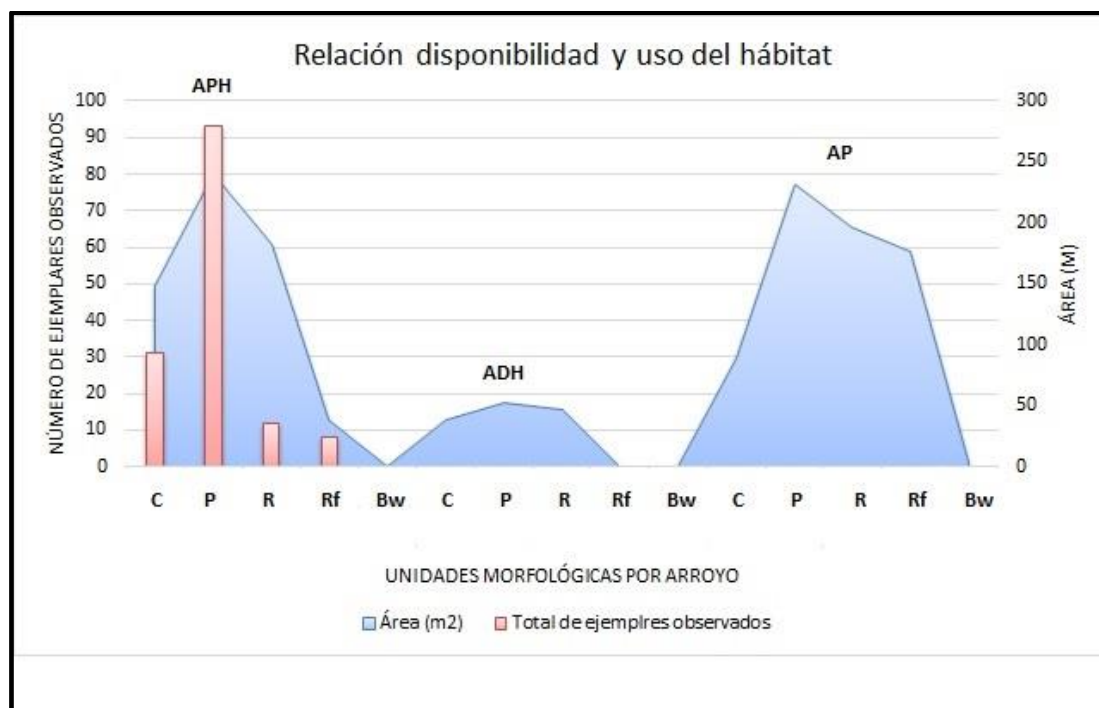


Figura 25: Relación de la disponibilidad de unidades morfológicas fluviales por arroyo (en azul), y presencia total de ejemplares de *R. iberica* por unidad morfológica fluvial (en rojo) en el Macizo de Peñalara. C: cascada, P: poza, R: run, Rf: corriente, Bw: remanso; APH: arroyo de Pepe Hernando, ADH: arroyo de Dos Hermanas, AP: arroyo de Peñalara.

Reintroducción y seguimiento

Se reintrodujeron un total de 938 ejemplares de *R. iberica* en el Arroyo de Dos Hermanas principalmente (tabla 6 y figura 26), y tan sólo cuando el salvelino estaba al borde del colapso en el Arroyo de Peñalara en el 2011, se procedió a reintroducciones en este arroyo.

Se recapturaron 30 juveniles de rana patilarga, 29 dentro del mismo año de liberación y tan sólo uno un año después de ser liberados, pero debido a la imposibilidad de identificar individualmente a los ejemplares, los datos presentados pueden estar sobreestimados. El 26.7% de los ejemplares fueron observados dentro de los primeros 40 días tras su reintroducción, y se localizaron principalmente cerca de pozas de caída (56.7%) o fuera del agua (13.3%). La viabilidad de los ejemplares liberados puede considerarse óptima ya que se observó en el arroyo de Peñalara reproducción continuada.

Tabla 6: Relación de ejemplares de *R. iberica* liberados por año y arroyo en el Macizo de Peñalara. Entre paréntesis, ejemplares recapturados.

	Arroyo Dos Hermanas	Arroyo Peñalara
2008	63	-
2009	60	-
2010	264 (23)	-
2011	131 (5)	258 (2)
2012	105	57
<u>Total</u>	623	315

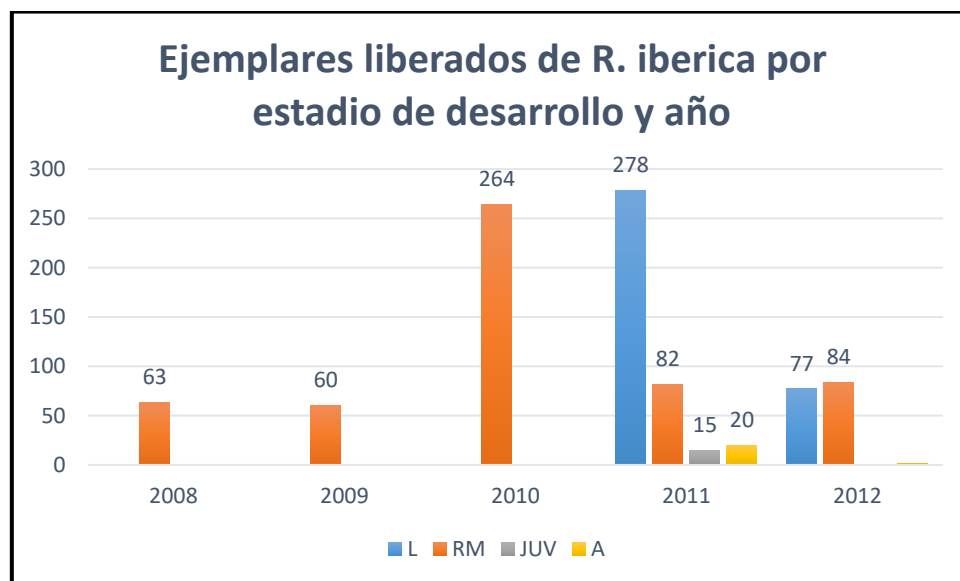


Figura 26: Relación de ejemplares de *R. iberica* liberados por año y estadio de desarrollo en el Macizo de Peñalara. L= larva, RM= recién metamórficos, JUV= juveniles, A= adultos. Como en el caso de sapo partero común, obsérvese el cambio de estrategia, liberando principalmente larvas una vez los salvelinos se consideraron prácticamente erradicados de la Hoya de Peñalara en el 2011.

Eliminación del salvelino

Del 2008 al 2012 se capturaron un total de 98 ejemplares de salvelino. En el arroyo de Dos Hermanas no se capturó ningún ejemplar desde 2009 (figura 27). Los ejemplares capturados u observados los últimos años fueron, principalmente, juveniles.

En la Hoya de Peñalara, pero fuera del rango donde se concentró el esfuerzo de pesca eléctrica, en el 2008 se capturaron 27 ejemplares de salvelino, no volviendo a encontrarse individuos en el 2009.

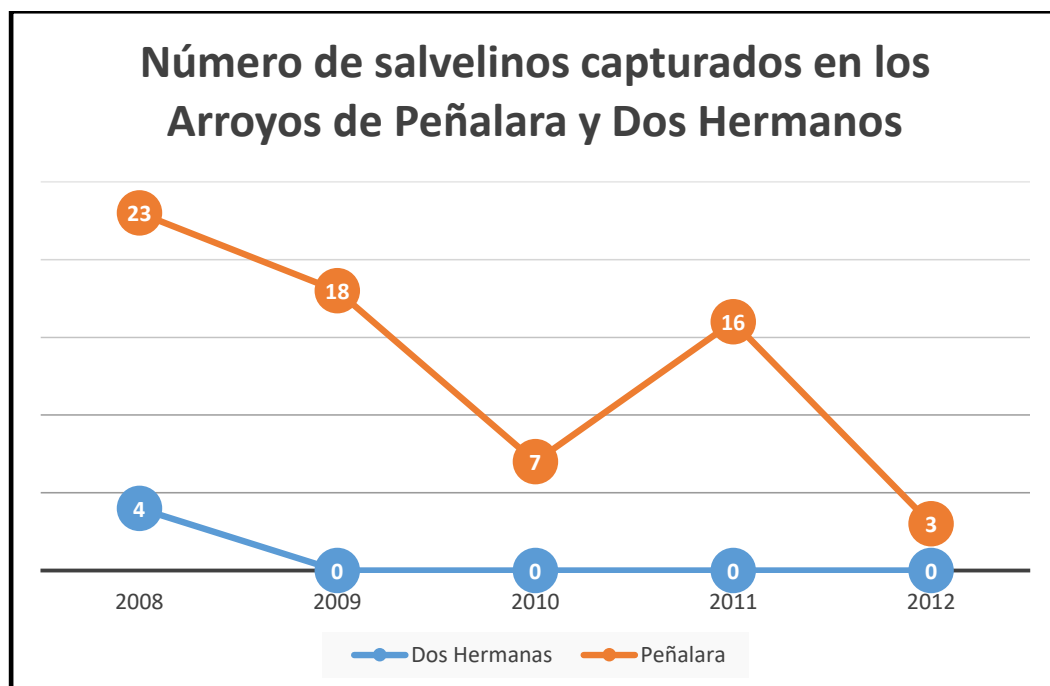


Figura 27: Número de salvelinos capturados durante el periodo 2008-2012 en los arroyos principales en el Macizo de Peñalara.

La salvaguarda del hábitat en el Macizo de Peñalara incluía la erradicación del salvelino de sus arroyos para facilitar la recolonización natural de la Hoya de Peñalara, limitada de por sí por la presencia de los salmónidos (Ryan *et al.* 2014). Knapp *et al.* (2001) sugirieron que la recuperación de la fauna local tras la introducción de una especie invasora depende del tiempo que la especie alóctona haya estado introducida y de la dinámica poblacional de la especie nativa, que está regulada, entre otros factores, por el clima, la interacción con humanos y la depredación (Rodríguez-Prieto & Fernández-Juricic 2005; Davis *et al.* 2017).

La pesca eléctrica, como herramienta de conservación, se había empleado en numerosos programas de control (Kulp & Moore 2000; Meyer *et al.* 2006; Peterson *et al.* 2008; Caudron & Champigneulle 2011). El mayor esfuerzo de erradicación se había realizado antes de comenzar el programa de cría en cautividad, por lo que los esfuerzos se centraron en mantener la presión de captura sobre la población del salvelino.

La eficacia de la pesca eléctrica varía en función del tamaño de la presa y la complejidad del hábitat, siendo mayor en arroyos pequeños de hábitats simples (Kulp & Moore 2000; Meyer *et al.* 2006), y siendo más dificultoso en animales de pequeño tamaño. Si bien este tipo de técnicas conlleva daños en los ejemplares capturados, ofrece la ventaja de ser específica. Korsu *et al.* (2009) observaron que cuando el salvelino y la trucha común coocurren en simpatria, se observa una segregación espacial, habitando los salvelinos las pozas de caída y las truchas comunes, las zonas de corriente. Esta distribución, observada en el Macizo de Peñalara (J. Bosch, *com. pers.*), posiblemente minimizara los posibles daños que la pesca eléctrica genera en los individuos. Quizá la principal desventaja de este método sea la inversión de tiempo necesario, en la que el salvelino puede compensar su bajo número aumentando las tasas de reclutamiento, crecimiento y fecundidad (Jensen 1971; Donald & J. 1989). En el arroyo de Pepe Hernando se precisaron cinco años, y en el arroyo de Dos Hermanas seis años, para eliminar completamente el salvelino de sus aguas.

Meronek *et al.* (1996), tras evaluar 250 programas de control de peces, concluyeron que más de la mitad de éstos no habían conseguido cumplir sus objetivos, y que aquellos que los habían alcanzado, estaban limitados a masas de agua de pequeño tamaño (Britton *et al.* 2011) y conllevaron, en numerosas ocasiones, daños colaterales en la fauna local (Britton *et al.* 2009). Es por ello que la erradicación del salvelino, empleando un método tan conciso como éste, adquiere gran valor.

Estrategias en los programas de reintroducción

La pérdida de diversidad genética que se produce en las colonias cautivas puede ser heredada por la población salvaje objeto de dichas reintroducciones, con una potencia que varía en función de la fuerza de la selección natural en el hábitat y de la tasa de intercambio génica entre la población cautiva y la salvaje (Ford 2002). Según los modelos estudiados por Ford (2002), la adición de ejemplares nuevos a las colonias cautivas no palia la disminución de variabilidad genética, de lo que se deduce que es más deseable proteger el medio natural que introducir ejemplares.

Elección de la población donadora

Uno de los primeros puntos importantes en el proceso de producción de ejemplares con garantías de éxito en la reintroducción es el origen de la población donadora (Zeisset & Beebee 2013), ya que si ésta no es cercana, se corre el riesgo de introducir genotipos mal adaptados (Frankham 2010). Sin embargo, hay ejemplos documentados de éxito en traslocaciones entre poblaciones que distan más de 200 kilómetros (Denton *et al.* 1997; Zeisset & Beebee 2013) sugiriéndose que un tamaño grande de la población donadora (*i.e* mayor diversidad genética y mayor plasticidad ambiental), es tan importante como el origen de la población en sí (Zeisset & Beebee 2013).

En declives asociados a *Bd*, se ha modelizado que los individuos supervivientes a un brote tienen más probabilidades de desarrollar y transmitir cierta resistencia frente a *Bd*, haciéndolos, por tanto, idóneos para la cría en cautividad (Briggs *et al.* 2005). Por este motivo, se escogió la población de sapo partero común del Macizo de Peñalara como donadora, a pesar de su consanguinidad.

En el caso de la rana patilarga, la decisión se basó por un lado en razones logísticas (mayor facilidad de transporte a las instalaciones del Centro de Cría), y por otro, en la coexistencia previa de la rana con la trucha en el arroyo de Pepe Hernando, lo que ocurriría en los arroyos de la Hoya de Peñalara. La capacidad de la rana patilarga de esta población para detectar a la trucha ya había sido confirmado previamente (Bosch *et al.* 2006b; Polo-Calviá *et al.* 2017).

Hábitat

El proceso de liberación puede ser un episodio muy estresante para los animales a reintroducir (Batson *et al.* 2015), por lo que elegir cuidadosamente los lugares de suelta es importante.

En el caso de la rana patilarga, el estudio de la selección del hábitat permitió confirmar, por un lado, los datos que Bosch *et al.* (2006b) habían observado con anterioridad en larvas, detectándose una mayor presencia alrededor de las pozas de caída de adultos, recién metamórficos y larvas y, por otro lado, permitió confirmar la inclinación de los juveniles por zonas húmedas. Esto es consistente con los resultados obtenidos en el experimento con juveniles, donde existe una correlación entre el agua aportada durante el desarrollo y la supervivencia. Así pues, los lugares de suelta más adecuados deberían ser pozas de caída, que, de hecho, es donde se realizaron las reintroducciones. Más aún, no se observaron diferencias significativas en la proporción de unidades morfológicas entre los tres arroyos (Peñalara, Dos

Hermanas y Pepe Hernando), por lo que podrían ser *a priori* los arroyos de la Hoya de Peñalara igualmente idóneos para reintroducciones.

La elección de los lugares de suelta del sapo partero común estaba, debido a la presencia de *Bd*, mucho más restringida. Se realizaron en los lugares donde la concentración de *Bd* era baja, *i.e* en las masas de agua estivales como la Laguna Chica. Dicha laguna suele desecarse a finales del verano, con lo que no hay larvas invernantes, siendo la concentración de *Bd* mucho menor. De esta estrategia podría criticarse dos aspectos: 1) Si *Bd* está presente, ¿realmente puede prosperar una reintroducción y, por tanto, se puede medir la viabilidad de los individuos producidos?, y 2) dado que las larvas de *A. obstetricans* permanecen en el agua en el Macizo de Peñalara al menos un año, ¿qué sentido tiene reintroducir ejemplares que, en caso de reproducirse, sus larvas podrán completar la metamorfosis en menos de 4 meses con tamaños de metamorfosis probablemente pequeños?, ¿cómo podría evaluarse, en este contexto, la viabilidad de la producción?. Brannelly *et al.* (2016a) demostraron la viabilidad de las reintroducciones en hábitats con *Bd* para *Litoria verreauxii alpina*, Watson, Loftus-Hills y Littlejohn 1971, observando además que los ejemplares reintroducidos provenientes de poblaciones que previamente habían estado en contacto con *Bd* tenían un *fitness* similar a las poblaciones diana de dichas liberaciones. Resultados similares ya habían sido demostrados previamente en el laboratorio (Bataille *et al.* 2015), lo que manifestaría la potencialidad de las reintroducciones. En cuanto a la segunda cuestión, la situación de la población del sapo partero común, y la alta concentración de *Bd* en numerosas masas del Macizo de Peñalara, no permitían estudiar otras opciones. Antes de los primeros brotes, había una población estable de *A. obstetricans* en la Laguna Chica, cuyas larvas podían invernar si a finales del verano llovía con suficiente intensidad como para que la laguna no se desecase completamente. La evaluación en este contexto de los ejemplares producidos es imposible.

Número y estadio de los animales reintroducidos

El número de reintroducciones que se han considerado exitosas requirieron la liberación de, al menos, mil ejemplares (Germano & Bishop 2009), y debieron ser monitorizadas cerca de una década para confirmar la capacidad de autosuficiencia de las poblaciones creadas (Griffiths & Pavajeau 2008; Rummel *et al.* 2016). Existe cierta controversia acerca de qué estadio de desarrollo sería el más indicado en una reintroducción. Por un lado las larvas, empleadas habitualmente en traslocaciones (Germano & Bishop 2009), muestran comportamientos filopátricos (Semlitsch 2002), mientras que los adultos muestran filopatría a los lugares de reproducción, lo que aumenta el riesgo de emigración (Semlitsch 2002).

Con respecto a *R. iberica*, se liberaron casi el doble de ejemplares que de sapo partero común, *i.e.* 938 ejemplares de rana patilarga frente a los 453 ejemplares de sapo partero común, observándose reproducción más o menos continuada a partir del 2013 (*i.e.* cuando el número de ejemplares liberados era cercano a mil, como sugerían Germano & Bishop (2009)). Al igual que con *A. obstetricans*, los estadios a reintroducir variaron a medida que el salvelino disminuía en la Hoya de Peñalara, procediéndose a liberar larvas en vez de recién metamórficos a partir del 2011 a pesar de que el salvelino seguía presente en la Hoya de Peñalara (figura 28), *i.e.* la extirpación total de la especie alóctona no es necesaria debido a la baja variabilidad y la estocasticidad de las poblaciones no naturales (Liebhold & Bascompte 2003). La liberación de juveniles ese mismo año corresponde a un ensayo fallido de cría en cautividad de adultos en el Centro de Cría. Los juveniles no se adaptaron a las condiciones del Centro, mostrando durante todo el tiempo síntomas de estrés (*e.g.* movimientos de huida) cada vez que debía manipularse la caja donde se encontraban.

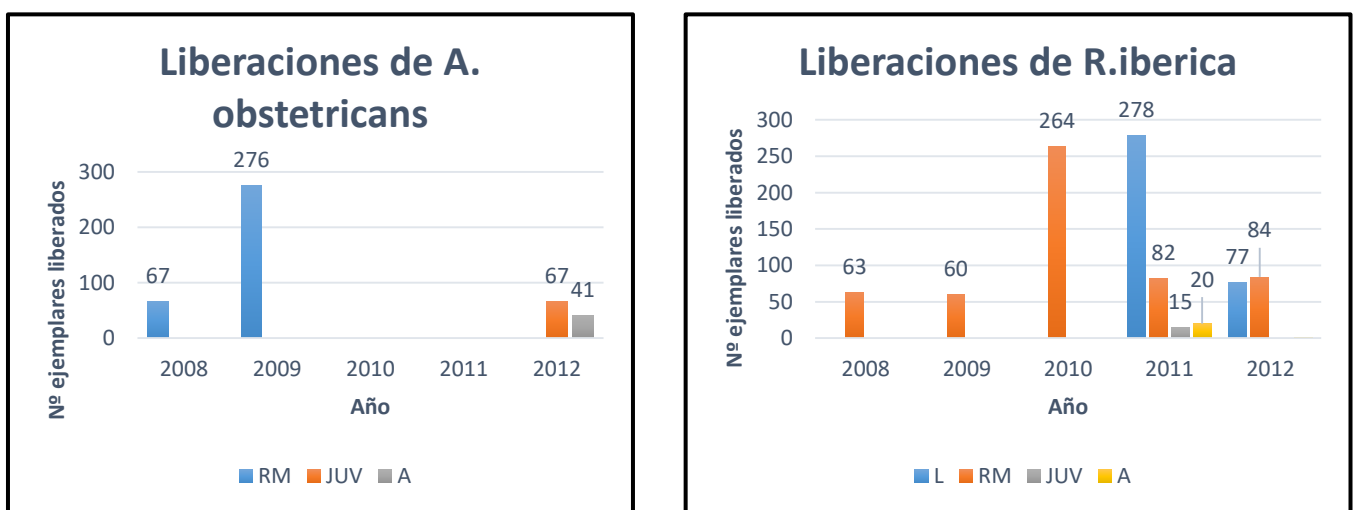


Figura 28: Comparación del número de ejemplares liberados totales por año y especie en el Macizo de Peñalara durante la duración de la Tesis, donde puede observarse el cambio de estrategia con el paso de los años (L= larvas, RM= recién metamórficos, JUV= juveniles, A= adultos).

IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES EN LAS INSTALACIONES DEL CENTRO DE CRÍA EN CAUTIVIDAD

Los resultados de la experimentación llevada a cabo tanto en larvas como en juveniles fue implementada en el Centro de Cría en cautividad como protocolos de manejo estandarizados. Los resultados sobre mortalidad fueron dispares en función de la especie:

1. *A. obstetricans*: Las mortalidades en el Centro de Cría se mantuvieron siempre bajas, en torno a los 38 ejemplares por año, perteneciendo un 88.52% de las muertes a larvas (figura 29). Las mortalidades de larvas del 2011 y 2012 coincidieron con la producción masiva de ejemplares en cautividad. Si bien se tomaron precauciones, separando las larvas de cada puesta en dos acuarios, algún tipo de infección desconocida acabó ambos años con una parte de las mismas. La mortalidad inusualmente alta de adultos en 2011 correspondió al periodo de hibernación natural.

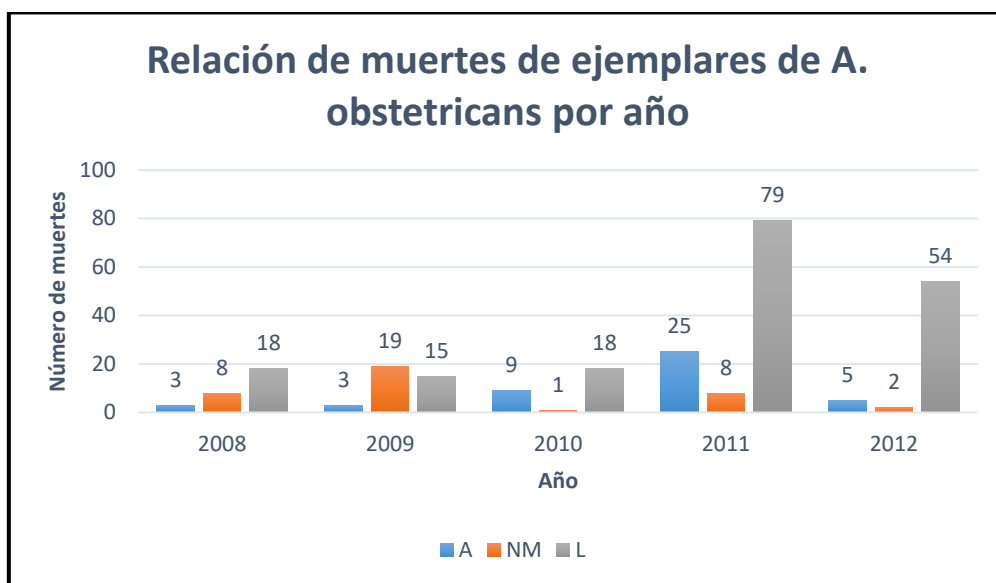


Figura 29: Relación de muertes de *A. obstetricans* por año en el Centro de Cría. A= adulto, NM= Nuevos metamórficos, L= larva. Se han excluido los datos del aquaterrario localizado en el puerto de Cotos, por no pertenecer a las instalaciones del Centro de Cría en Cautividad.

2. *R. iberica*: la tasa de supervivencia larvaria fue moderada, en torno a un 67%, reduciéndose drásticamente a un 35% en juveniles (figura 30). Puede observarse que en el 2011, el número de muertes fue muy bajo, posiblemente debido a que en ese año el

verano fue más frío de lo habitual, y las larvas, a finales de agosto, no habían finalizado la metamorfosis. En el 2012, las larvas capturadas fueron empleadas en su totalidad para un experimento, por lo que los datos de supervivencia no han sido tenidos en cuenta. Aunque en condiciones de no cautividad se han estimado promedios de supervivencia muy inferiores para especies del género *Rana* (Cecil & Just 1979; Gosá 2003), la muertes masivas de juveniles en las instalaciones del Centro de Cría indicaban que, o bien las larvas o bien los juveniles crecían en ambientes subóptimos.

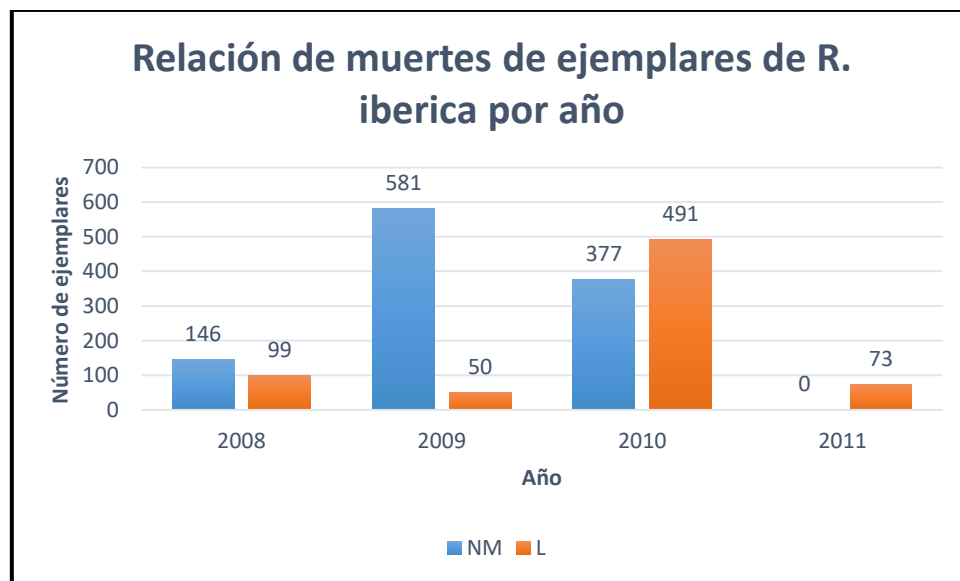


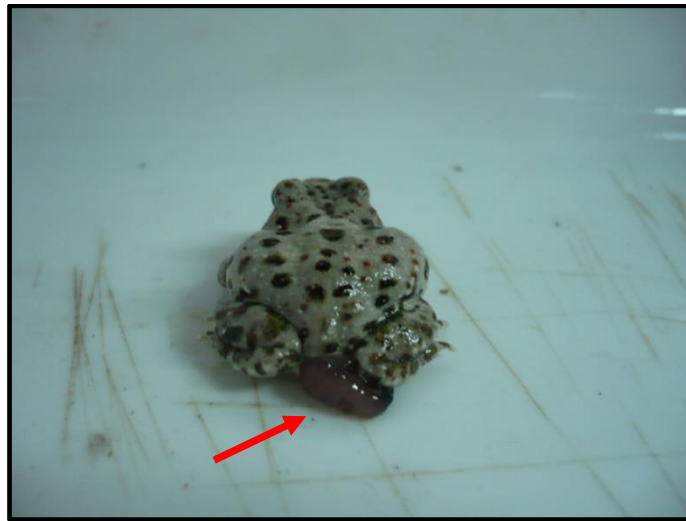
Figura 30: Comparación de muertes de *R. iberica* por año y estadio de desarrollo en el Centro de Cría. NM= Nuevos metamórficos, L= larva

Los requerimientos ambientales en el género *Alytes*, parecen ser no muy elaborados (Wells *et al.* 2015), no siendo así los de *R. iberica*. Quizá se debió cuidar más este aspecto durante la cría, pero hay que considerar las limitaciones económicas y físicas del Centro de Cría. Más aún, una vez conseguido erradicar al salvelino de las secciones altas del arroyo de Peñalara y Dos Hermanas, se abandonó la cría en cautividad de rana patilarga, procediéndose a traslocaciones de larvas desde Pepe Hernando a la Hoya de Peñalara.

Las enfermedades observadas en el Centro de Cría entre los juveniles de ambas especies, fueron principalmente, malformaciones tras la metamorfosis, siendo dichos ejemplares sacrificados (figura 31). De especial importancia eran las malformaciones en el sapo partero común, lo que hacía intuir la consanguineidad de la población del Macizo y el probable cuello de botella sufrido

tras la debacle poblacional de finales de los años 90. Otras de las enfermedades observadas fue la evaginación intestinal, normalmente producida cuando los anfibios engullen presas más grandes que su tamaño, o bien cuando han ingerido pequeñas piedras u otros fragmentos junto a una presa (figura 31). La forma de tratar esta dolencia era mediante baños de una hora en agua con azúcar.

a)



b)



c)

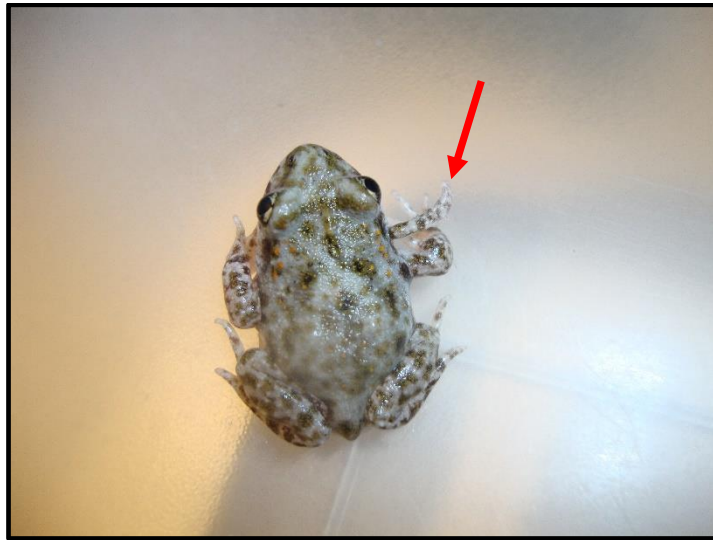


Figura 31: Diferentes enfermedades observadas en el sapo partero común en la colonia cautiva del Centro de Cría: a) evaginación intestinal; b) ausencia del final de una extremidad; c) crecimiento de una extremidad adicional en la cabeza.



Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados son las siguientes:

1. Se han establecido protocolos de trabajo en la cría en cautividad tanto para *A. obstetricans* como para *R. iberica*.
2. El tratamiento *in situ* recomendado contra la quitridiomycosis en *A. obstetricans* es el Itraconazol a una concentración de 0.0001%.
3. Se ha mejorado la viabilidad *in situ* de los ejemplares criados en cautividad de *R. iberica* mediante la aplicación de los protocolos desarrollados.
4. Se ha desarrollado un método de reproducción en cautividad de *A. obstetricans* con éxito en la que la hibernación, pese a ser una población de alta montaña, no es necesaria.
5. Se ha implementado con éxito un sistema de cría en cautividad de *A. obstetricans* en el que se recomienda que los recién metamórficos permanezcan en las cajas colectivas.
6. Se han producido con éxito ejemplares de *A. obstetricans* y *R. iberica* que han sobrevivido tras su reintroducciones.



Bibliografía

- Abrams PA, Leimar O, Nylin S, Wicklund C. 1996. The effect of flexible growth rates on optimal size and development times in seasonal environment. *The American Naturalist* **147**:381–395.
- Adama D, Consulting A, Woodbridge B, Krebs J, Herring S. 2004. Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Recovery : Captive rearing and reintroduction in Southeast British Columbia , 2003. Columbia Basin Fish and Wildlife Compensation Program.
- Albert EM, Fernández-Beaskoetxea S, Godoy JA, Tobler U, Schmidt BR, Bosch J. 2015. Genetic management of an amphibian population after a chytridiomycosis outbreak. *Conservation Genetics* **16**:103–111.
- Aldridge G, Inouye DW, Forrest JRK, Barr WA, Miller-Rushing AJ. 2011. Emergence of a mid-season period of low floral resources in a montane meadow ecosystem associated with climate change. *Journal of Ecology* **99**:905–913.
- Alford RA, Bradfield KS, Richards SJ. 2007. Ecology: Global warming and amphibian losses. *Nature* **447**:3–6.
- Alford RA, Richards SJ. 1999. Global amphibian declines:a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**:133–65.
- Allentoft ME, O'Brien J. 2010. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: A review. *Diversity* **2**:47–71.
- Altwegg R, Reyer H. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* **57**:872–882.
- Álvarez D, Nicieza AG. 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* **16**:640–648.
- Araújo MB, Guilhaumon F, Neto DR, Pozo IRC. 2011. Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de la biodiversidad española. Fauna de vertebrados. Dirección general de medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid.
- Araújo MB, Lobo JM, Moreno JC. 2007. The effectiveness of Iberian protected areas in conserving terrestrial biodiversity. *Conservation Biology* **21**:1423–1432.
- Arendt JD. 1997. Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *The quarterly review of biology* **72**:149–177.
- Armstrong DP, Seddon PJ. 2008. Directions in reintroduction biology. *Trends in Ecology and Evolution* **23**:20–25.
- Arntzen JW, Abrahams C, Meilink WRM, Losif R, Zuiderwijk A. 2017. Amphibian decline, pond loss and reduced population connectivity under agricultural intensification over a 38 year period. *Biodiversity and Conservation* **26**:1411–1430.
- Bataille A, Cashins SD, Grogan L, Skerrat LF, Hunter D, McFadden M, Scheele B, Brannelly LA, Macris A, Harlow PS, Bell S, Berger L, Waldman. 2015. Susceptibility of amphibians to chytridiomycosis is associated with MHC class II conformation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**:20143127–20143127.
- Batson W, Abbott R, Richardson K. 2015. Release strategies for fauna reintroductions: theory and tests. *Advances in Reintroduction Biology of Australian and New Zealand Fauna*.

- Becker CG, Rodriguez D, Longo AV., Talaba AL, Zamudio KR. 2012. Disease risk in temperate amphibian populations is higher at closed-canopy sites. *PLoS ONE* **7**:1–7.
- Beebee TJC, Griffiths RA. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation* **125**:271–285.
- Bellis ED. 1962. The Influence of humidity on wood frog activity. *American Midland Naturalist* **68**:139–148.
- Berger L, Marantelli G, Skerratt LF, Speare R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* **68**:47–50.
- Berven KA. 2009. Density dependence in the terrestrial stage of wood frogs: evidence from a 21-year population study. *Copeia* **2009**:328–338.
- Biega A, Greenberg DA, Mooers AO, Jones OR, Martin TE. 2017. Global representation of threatened amphibians ex situ is bolstered by non-traditional institutions, but gaps remain. *Animal Conservation* **20**:113–119.
- Bishop PJ, Speare R, Poulter R, Butler M, Speare BJ, Hyatt A, Olsen V, Haigh A. 2009. Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* **84**:9–15.
- Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PTJ, Buck JC, Gervasi SS, Kats LB. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1223**:108–119. Blackwell Publishing Inc.
- Blaustein AR, Kiesecker JM. 2002. Complexity in conservation : Lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* **5**:597–608.
- Blaustein AR, Walls SC, Bancroft BA, Lawler JJ, Searle CL, Gervasi SS. 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity* **2**:281–313.
- Bloxam Q, Tonge S. 1995. Amphibians: suitable candidates for breeding-release programmes. *Biodiversity & Conservation* **4**:636–644.
- Boone MD. 2005. Juvenile frogs compensate for small metamorph size with terrestrial growth: overcoming the effects of larval density and insecticide exposure. *Journal of Herpetology* **39**:416–423.
- Bosch J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios : enfermedades emergentes. *Munibe* **16**:56–71.
- Bosch J. 2005. Actuaciones recientes para la conservación de los anfibios de Peñalara. Quintas Jornadas Científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páucar. Dirección General del Medio Natural, Consejería del Medio Ambiente, Madrid.
- Bosch J, Carrascal LM, Durán L, Walker SF, Fisher MC. 2007. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **274**:253–260.
- Bosch J, García-Alonso D, Fernández-Beaskoetxea S, Fisher MC, Garner TWJ. 2013. Evidence for the introduction of lethal chytridiomycosis affecting wild betic midwife toads (*Alytes dickhilleni*). *EcoHealth* **10**:82–89.
- Bosch J, González-Miras E. 2012. Seguimiento de *Alytes dickhilleni*: Informe final. Monografías

- SARE, Asociación Herpetológica Española - Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid.
- Bosch J, Márquez R. 1996. Discriminant functions for sex identification in two midwife toads (*Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*). *Herpetological Journal* **6**:105–109.
- Bosch J, Martínez-Solano I. 2006a. Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. *Oryx* **40**:84–89.
- Bosch J, Martínez-Solano I, García-París M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infections involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* **97**:331–337.
- Bosch J, Rincón PA, Boyero L, Martínez-Solano I. 2006b. Effects of Introduced Salmonids on a Montane Population of Iberian Frogs. *Conservation Biology* **20**:180–189.
- Bosch J, Sánchez-Tomé E, Fernández-Loras A, Oliver JA, Fisher MC, Garner TWJ. 2015. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biology Letters* **11**:20150874.
- Both C, Kaefer IL, Santos TG, Cechin STZ. 2008. An austral anuran assemblage in the Neotropics: Seasonal occurrence correlated with photoperiod. *Journal of Natural History* **42**:205–222.
- Bouck GR. 2011. Etiology of Gas bubble disease. *Transactions of the American Fisheries Society* **109**:703–707.
- Bowkett AE. 2009. Recent captive-breeding proposals and the return of the ark concept to global species conservation. *Conservation Biology* **23**:773–776.
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT, Hyatt AD. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**:141–148.
- Brannelly LA, Hunter DA, Skerratt LF, Scheele BC, Lenger D, Mcfadden MS, Harlow PS, Berger L. 2016a. Chytrid infection and post-release *fitness* in the reintroduction of an endangered alpine tree frog. *Animal Conservation* **19**:153–162.
- Brannelly LA, Richards-Zawacki CL, Pessier AP. 2012. Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* **101**:95–104.
- Brannelly LA, Webb R, Skerratt LF, Berger L. 2016b. Amphibians with infectious disease increase their reproductive effort: evidence for the terminal investment hypothesis. *Open Biology* **6**:150251.
- Briggs CJ, Vredenburg VT, Knapp RA, Rachowicz LJ. 2005. Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: An emerging infectious disease of amphibians. *Ecology* **86**:3149–3159.
- Britton JR, Davies GD, Brazier M. 2009. Towards the successful control of the invasive *Pseudorasbora parva* in the UK. *Biological Invasions* **12**:125–131.
- Britton JR, Gozlan RE, Copp GH. 2011. Managing non-native fish in the environment. *Fish and Fisheries* **12**:256–274.
- Browne RK, Zippel K. 2007. Reproduction and larval rearing of amphibians. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **48**:214–234.
- Canessa S, Genta P, Jesu R, Lamagni L, Oneto F, Salvidio S, Ottonello D. 2016. Challenges of monitoring reintroduction outcomes: Insights from the conservation breeding program of

- an endangered turtle in Italy. *Biological Conservation* **204**:128–133.
- Carey C. 1978. Factors affecting body temperature of toads. *Oecologia* **35**:197–219.
- Carey C, Corn PS, Jones MS, Livo LJ, Muths E, Loeffler CW. 2005. Factors limiting the recovery of boreal toads. *Amphibian declines: the conservation status of United States species. Volume 1. Conservation essays.* University of California Press, Berkeley, California, USA.
- Carr JA. 2011. Stress and reproduction in amphibians. *Hormones and Reproduction of Vertebrates - Amphibians.* London: Academic press.
- Carter I, Foster J, Lock L. 2017. The role of animal translocations in conserving british wildlife: an overview of recent work and prospects for the future. *EcoHealth* **14**:7–15.
- Cashins SD, Grogan LF, McFadden M, Hunter D, Harlow PS, Berger L, & Skerratt LF. 2013. Prior infection does not improve survival against the amphibian disease chytridiomycosis. *PloS ONE*, **8**(2) e56747.
- Caudron A, Champigneulle A. 2011. Multiple electrofishing as a mitigate tool for removing nonnative Atlantic brown trout (*Salmo trutta* L.) threatening a native Mediterranean brown trout population. *European Journal of Wildlife Research* **57**:575–583.
- Caughley G. 1994. Directions in conservation biology. *The Journal of Animal Ecology* **63**:215.
- Cecil SG, Just JJ. 1979. Survival rate, population density and development of a naturally occurring anuran larvae (*Rana catesbeiana*). *Copeia* **1973**:447–453.
- Ceríaco LMMP. 2012. Human attitudes towards herpetofauna: The influence of folklore and negative values on the conservation of amphibians and reptiles in Portugal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **8**:8.
- Chatfield MWH, Brannelly LA, Robak MJ, Freeborn L, Lailvaux SP, Richards-Zawacki CL. 2013. Fitness consequences of infection by *Batrachochytrium dendrobatidis* in northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). *EcoHealth* **10**:90–98.
- Chatfield MWH, Richards-Zawacki CL. 2011. Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Diseases of Aquatic Organisms* **94**:235–238.
- Christie MR, Marine ML, French RA, Blouin MS. 2012. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:238–242.
- Cohen MP, Alford. RA. 1993. Growth, survival, and activity patterns of *Bufo marinus* metamorphs. *Wildlife Research* **20**:1–13.
- Collins JP, Storfer A. 2003. Global amphibian declines : sorting the hypotheses - Special Issue: Amphibian Declines:89–98.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* **5**:735–748.
- Davis CL, Miller DAW, Walls SC, Barichivich WJ, Riley JW, Brown ME. 2017. Species interactions and the effects of climate variability on a wetland amphibian metacommunity: Ecological Applications **27**:285–296.
- De Pedraza Gilsanz J. 2002. Peñalara: ¿un paradigma para la conservación de las montañas?. *Segundas Jornadas Científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páular.* Dirección General del Medio Natural, Consejería de Medio Ambiente, Madrid.

- Densmore CL, Green DE. 2007. Diseases of amphibians. *ILAR Journal* **48**:235–254.
- Denton JS, Hitchings SP, Beebee TJC, Gent A. 1997. A Recovery Program for the Natterjack Toad (*Bufo calamita*) in Britain. *Conservation Biology* **11**:1329–1338.
- Dodd CK, Seigel RA. 1992. Relocation, repatriation, and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work? *Biological Conservation* **62**:230.
- Donald DB, Alger DJ. 1989. Evaluation of exploitation as a means of improving growth in a stunted population of brook trout. *North American Journal of Fisheries Management* **9**:177–183.
- Eilers JM, Truemper HA, Jackson LS, Eilers BJ, Loomis DW. 2011. Eradication of an invasive cyprinid (*Gila bicolor*) to achieve water quality goals in Diamond Lake, Oregon (USA). *Lake and Reservoir Management* **27**:194–204.
- Farrer RA, Weinert LA, Bielby J, Garner TWJ, Balloux F, Clare F, Bosch J, Cunningham AA, Weldon C, du Preez LH, Anderson L, Kosakovsky Pond SL, Shahar-Golan R, Henk DA, Fisher MC. 2011. Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:18732 LP-18736.
- Fernández-Beaskoetxea S, Bosch J, Bielby J. 2016. Infection and transmission heterogeneity of a multi-host pathogen (*Batrachochytrium dendrobatidis*) within an amphibian community. *Diseases of Aquatic Organisms* **118**:11–20.
- Flores-Nava A, Vera-Muñoz P. 1999. Growth, metamorphosis and feeding behaviour of *Rana catesbeiana* Shaw 1802 tadpoles at different rearing densities. *Aquaculture Research* **30**:341–347.
- Ford MJ. 2002. Selection in captivity during supportive breeding may reduce fitness in the wild. *Conservation Biology* **16**:815–825.
- Frankham R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* **17**:325–333.
- Frankham R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* **143**:1919–1927.
- Gagliardo R, Crump P, Griffith E, Mendelson J, Ross H, Zippel K. 2008. The principles of rapid response for amphibian conservation, using the programmes in Panama as an example. *International Zoo Yearbook* **42**:125–135.
- García-París M, Montori M, Herrero P. 2004. Amphibia, Lissamphibia. En: Fauna ibérica, vol. 24. Ramos MA, Alba Tercedor J, Bellés i Ros X, Gosálbez i Noguera J, Guerra Sierra Á, Macpherson Mayol E, Serrano Marino J, Templado González J (Eds.) Fauna Ibérica. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid: 43-275.
- Garner TWJ, Garcia G, Carroll B, Fisher MC. 2009. Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* **83**:257–260.
- Germano JM, Bishop PJ. 2009. Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Conservation Biology* **23**:7–15.
- Gomendio M, Roldán E, Garner TWJ, Espeso G, Garde J, Espeso G. 2006. El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación animal. *Ecosistemas* **15**:50–57.

- Gosá A. 2003. La recuperación del hábitat y la gestión de la rana ágil en Navarra. *Munibe* **16**:128–139.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**:183–190.
- Gozlan RE, Britton JR, Cowx I, Copp GH. 2010. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology* **76**:751–786.
- Graham KM, Kouba AJ, Langhorne CJ, Marcec RM, Willard ST. 2016. Biological sex identification in the endangered dusky gopher frog (*Lithobates sevosa*): a comparison of body size measurements, secondary sex characteristics, ultrasound imaging, and urinary hormone analysis methods. *Reproductive Biology and Endocrinology* **14**:41.
- Granados I, Toro M, Rubio-Romero A. 2006. Laguna Grande de Peñalara. 10 años de seguimiento limnológico. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid.
- Gray MJ, Smith LM. 2005. Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. *Journal of Wildlife Management* **69**:515–524.
- Gresswell R. 1991. Use of antimycin for removal of brook trout from a tributary of Yellowstone Lake. *North American Journal of Fisheries Management* **11**:83–90.
- Griffiths B, Scott JM, Carpenter JW, Reed C. 1989. Translocation as a species conservation tool: Status and strategy. *Science* **245**:477–480.
- Griffiths RA. 2017. Which amphibians should qualify for the ark? *Animal Conservation* **20**:120–121.
- Griffiths RA, Pavajeau L. 2008. Captive breeding, reintroduction, and the conservation of amphibians. *Conservation Biology* **22**:852–861.
- Gromko MH, Mason FS, Smith-Gill SJ. 1973. Analysis of the crowding effect in *Rana pipiens* tadpoles. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **186**:63–71.
- Hailey A, Mohammed A, Sookoo N, Khan A. 2006. Factors affecting tadpole growth: Development of a rearing system for the neotropical leptodactylid *Physalaemus pustulosus* for ecotoxicological studies. *Applied Herpetology* **3**:111–128.
- Hanlon SM, Kerby JL, Parris MJ. 2012. Unlikely remedy: Fungicide clears infection from pathogenic fungus in larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenoccephalus*). *PLoS ONE* **7**:1–8.
- Harding G, Griffiths RA, Pavajeau L. 2016. Developments in amphibian captive breeding and reintroduction programs. *Conservation Biology* **30**:340–349.
- Hardy BM, Pope KL, Piovia-Scott J, Brown RN, Foley JE. 2015. Itraconazole treatment reduces *Batrachochytrium dendrobatidis* prevalence and increases overwinter field survival in juvenile cascades frogs. *Diseases of Aquatic Organisms* **112**:243–250.
- Harper EB, Semlitsch RD. 2007. Density dependence in the terrestrial life history stage of two anurans. *Oecologia* **153**:879–889.
- Helmstedt KJ, Possingham HP. 2017. Costs are key when reintroducing threatened species to multiple release sites. *Animal Conservation* **20**:331–340.
- Hite JL, Bosch J, Fernández-Beaskoetxea S, Medina D, Hall SR. 2016. Joint effects of habitat ,

- zooplankton, host stage structure and diversity on amphibian chytrid. *Proceedings of the Royal Society B* **283**: 20160832.
- Hogan LA, Lisle AT, Johnston SD, Goad T, Robertston H. 2013. Adult and juvenile sex identification in threatened monomorphic geocrinia frogs using fecal steroid analysis. *Journal of Herpetology* **47**:112–118.
- Hurlbert SH. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological monographs* **54**(2):187–211.
- Imasuen AA, Aisien MSO, Weldon C, Dalton DL, Kotze A, Du Preez LH. 2011. Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations of Okomu National Park, Nigeria. *Herpetological Review* **42**:379–382.
- IUCN/SSC. 2013. Guidelines for reintroductions and other conservation translocations. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.
- IUCN/SSC. 2014. Guidelines on the Use of Ex Situ Management for Species Conservation. Version 2.0. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.
- IUCN 2017. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Versión 2017-3 . < <http://www.iucnredlist.org> >. Descargada el 17 de enero de 2017
- Jensen AL. 1971. Response of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) populations to a fishery. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **28**:458–460.
- Johnson ML, Speare R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: Quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases* **9**:922–925.
- Jones MEB, Paddock D, Bender L, Allen JL, Schrenzel MS, Pessier AP. 2012. Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. *Diseases of Aquatic Organisms* **99**:243–249.
- Jørgensen C. 1986. External and internal control of patterns of feeding, growth and gonadal function in a temperate zone anuran, the toad *Bufo bufo*. *Journal of Zoology* **210**:211–241.
- Kendall K. 2002. Survey protocol for the northern leopard frog. *Alberta Species at Risk Report* No, 43.
- Keulartz J. 2015. Captivity for Conservation? Zoos at a crossroads. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **28**:335–351.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. 2010. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution* **25**:109–118.
- Kinne O. 2004. Successful re-introduction of the newts *Triturus cristatus* and *T. vulgaris*. *Endangered Species Research* **1**:25–40.
- Kinne O, Kunert J, Zimmermann W. 2006. Breeding , rearing and raising the red-bellied toad *Bombina orientalis* in the laboratory. *Endangered Species Research* **1**:11–23.
- Knapp RA, Matthews KR, Sarnelle O. 2001. Resistance and resilience of alpine lake fauna to fish introductions. *Ecological Monographs* **71**:401–421.
- Knapp RA, Fellers GM, Kleeman PM, Miller DAW, Vredenburg VT, Rosenblum EB, Briggs CJ. 2016. Large-scale recovery of an endangered amphibian despite ongoing exposure to multiple stressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**:11889–11894.
- Knapp RA, Matthews KR. 1998. Eradication of nonnative fish by gill-netting from a small

- mountain lake in California. *Restoration Ecology* **6**:207–213.
- Korsu K, Huusko A, Muotka T. 2009. Does the introduced brook trout (*Salvelinus fontinalis*) affect growth of the native brown trout (*Salmo trutta*)? *Naturwissenschaften* **96**:347–353.
- Kouba AJ, Vance CK, Willis EL. 2009. Artificial fertilization for amphibian conservation: Current knowledge and future considerations. *Theriogenology* **71**:214–227.
- Kraaijeveld-Smit FJL, Griffiths RA, Moore RD, Beebee TJC. 2006. Captive breeding and the fitness of reintroduced species: A test of the responses to predators in a threatened amphibian. *Journal of Applied Ecology* **43**:360–365.
- Kruger KM, Pereoglou F, Hero JM. 2007. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in eastern Australia. *Conservation Biology* **21**:1280–1290.
- Kulp MA, Moore SE. 2000. Multiple electrofishing removals for eliminating rainbow trout in a small southern appalachian stream. *North American Journal of Fisheries Management* **20**:259–266.
- Laurila A, Pakkasmaa S, Merilä J. 2006. Population divergence in growth rate and antipredator defences in *Rana arvalis*. *Oecologia* **147**:585–595.
- Lea J, Dyson ML, Halliday T. 2001. Calling by male midwife toads stimulates females to maintain reproductive condition. *Animal Behaviour* **61**:373–377.
- Liebold A, Bascompte J. 2003. The Allee effect, stochastic dynamics and the eradication of alien species. *Ecology Letters* **6**:133–140.
- Loman J. 2002. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. *Journal of Zoology* **258**:115–129.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* **91**:219.
- Loyau A, Cornuau JH, Clare FC. 2016. Side effects of itraconazole on post-metamorphic *Alytes obstetricans* after a cold stress. *Amphibia-Reptilia* **37**:345 – 357.
- Martel A et al. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:15325–15329.
- Martínez IP, Álvarez R, Herráez MP. 1996. Growth and metamorphosis of *Rana perezi* larvae in culture: Effects of larval density. *Aquaculture* **142**:163–170.
- Masser MP, Rakocy J, Losordo TM. 1992. Recirculating aquaculture tank production systems management of recirculating systems. Southern Regional Aquaculture Center:1–12.
- Mayol J, Oliver J. 2009. El ferreret, del descubrimiento a la conservación. *Septimas Jornadas científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páular*, Dirección General del Medio Natural, Madrid.
- Mendelson III JR, Altig R. 2015. Tadpoles, froglets, and conservation: A discussion of basic principles of rearing and release procedures. *Amphibian & Reptile Conservation* **10**:20–27.
- Meronek TG, Bouchard PM, Buckner ER, Burri TM, Demmerly KK, Hatleli DC, Klumb RA, Schmidt SH, Coble DW. 1996. A review of fish control projects. *North American Journal of Fisheries Management* **16**:63–74.
- Meyer KA, Lamansky JA, Schill DJ. 2006. Evaluation of an unsuccessful brook trout electrofishing

- removal project in a small rocky mountain stream. *North American Journal of Fisheries Management* **26**:849–860.
- Michaels CJ, Downie JR, Campbell-Palmer R. 2014. The importance of enrichment for advancing amphibian welfare and conservation goals : A review of a neglected topic. *Amphibian & Reptile Conservation* **8**:7–23.
- Michaels CJ, Fahrbach M, Harding L, Bryant Z, Capon-Doyle JS, Grant S, Gill I, Tapley B. 2016. Relating natural climate and phenology to captive husbandry in two midwife toads (*Alytes obstetricans* and *A. Cisternasii*) from different climatic zones. *Alytes* **33**:2–11.
- Michaels CJ, Preziosi RF. 2015. *Fitness* effects of shelter provision for captive amphibian tadpoles. *Herpetological Journal* **25**:7–12.
- Morgan KN, Tromborg CT. 2007. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* **102**:262–302.
- Muths E, Fisher RN. 2017. An alternative framework for responding to the amphibian crisis. *Oryx* **51**:210–213.
- Newman RA. 1998. Ecological constraints on amphibian metamorphosis: interactions of temperature and larval density with responses to changing food level. *Oecologia* **115**:9–16.
- Newman RA, Dunham AE. 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus Couchii*). *Copeia* **2**:372–381.
- Nichols DK, Lamirade EW. 2001. Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog* **46**:1
- O'Donnell K, Messerman A, Barichivich J, Semlitsch WD, Gorman R, Mitchell TG, Harold A, Fenolio N, Green D, Johnson A, Keever F, Mandica A, Martin M, Mott J, Peacock J, Reinman T, Romanach J, Titus S, McGowan G, Walls S. 2017. Structured decision making as a conservation tool for recovery planning of two endangered salamanders. *Journal for Nature Conservation* **37**:66–72.
- Oliver J, Manzano X, Pinya S. 2009. Els plans de recuperació del ferreret (*Alytes muletensis* Sanchiz & Adrover, 1979): 19 anys de seguiment de les poblacions a la Serra de Tramuntana. *Jornades de Biodiversitat Del Paratge Natural de La Serra de Tramuntana*, S. Pinya & MA v anrell , eds.
- Paniagua R, Fraile B, Saez FJ. 1990. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histology and Histopathology* **5**:365–378.
- Patrick W, Downie JR. 2005. The effects of shelter availability and substrate quality on behaviour and post-metamorphic growth in three species of anurans: implications for captive breeding. *Herpetological Journal* **15**:245–255.
- Peel AJ, Hartley M, Cunningham AA. 2012. Qualitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* **98**:95–112.
- Pérez I, Anadón JD, Díaz M, Nicola GG, Tella JL, Giménez A. 2012. What is wrong with current translocations? A review and a decision-making proposal. *Frontiers in Ecology and the Environment* **10**:494–501.
- Pessier AP, Mendelson JR. 2009. A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. *Proceedings from a Workshop: San Diego Zoo*:16–18.

- Peterson DP, Fausch KD, Watmough J, Cunjak RA. 2008. When eradication is not an option: modeling strategies for electrofishing suppression of nonnative brook trout to foster persistence of sympatric native cutthroat trout in small streams. *North American Journal of Fisheries Management* **28**:1847–1867.
- Peterson DP, Fausch KD, White GC. 2004. Population ecology of an invasion : effects of brook trout on native cutthroat trout. *Ecological Applications* **14**:754–772.
- Phuge SK. 2017. High temperatures influence sexual development differentially in male and female tadpoles of the Indian skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. *Journal of Biosciences* **42**:449–457.
- Pinya S, Pérez-Mellado V. 2009. Individual identification and sexual dimorphism in the endangered balearic midwife toad, *Alytes muletensis* (Sanchiz and Adrover, 1981). *Amphibia-Reptilia* **30**:439–443.
- Pinya S, Pérez-Mellado V. 2013. Ageing and growth of the endangered midwife toad *Alytes muletensis*. *Endangered Species Research* **22**:263–268.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* **96**:9–15.
- Pleguezuelos J, Márquez R, Lizana M. 2002. Conservación de los anfibios y reptiles de España. atlas y libro rojo de los reptiles y anfibios de España. Dirección General de la Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid.
- Pohar M, Blas M, Turk S. 2004. comparison of logistic regression and linear discriminant analysis: a simulation study. *Metodološki zvezki* **1**:143–161.
- Polo-Calvia N, Boyero L, Martín-Beyer B, Bosch J. 2017. Joint effects of rising temperature and the presence of introduced predatory fish on montane amphibian populations. *Animal Conservation* **20**:128–134.
- Rachowicz LJ, Vredenburg VT. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases Of Aquatic Organisms* **61**:75–83.
- Rastogi RK, Pinelli C, Polese G, D’Aniello B, Chieffi-Baccari G. 2011. Hormones and reproductive cycles in anuran amphibians. *Hormones and Reproduction of Vertebrates - Volume 2* **2**:171–186.
- Reyer H-U, Battig I. 2004. Identification of reproductive status in female frogs - a quantitative comparison of nine methods. *Herpetologica* **60**:349–357.
- Rodríguez-Prieto I, Fernández-Juricic E. 2005. Effects of direct human disturbance on the endemic Iberian frog *Rana iberica* at individual and population levels. *Biological Conservation* **123**:1–9.
- Román A, Mayol J. 1997. La recuperació del ferreret. Palma de Mallorca: Conselleria de Medi Ambient, Ordenació del Territori i Litoral.
- Rubio X, Etxezarreta J. 2003. Plan de reintroducción y seguimiento de la ranita meridional (*Hyla meridionalis*) en Mendizorrotz (Gipuzkoa, País Vasco) (1998-2003). *Munibe*:160–177.
- Rummel L, Abraín AM, Mayol J, Olmo JR, Mañas F, Jiménez J, Gómez JA, Oro D. 2016. Use of wild-caught individuals as a key factor for success in vertebrate translocations. *Animal Biodiversity and Conservation* **39**:207–220.
- Ryan ME, Palen WJ, Adams MJ, Rochefort RM. 2014. Amphibians in the climate vise: Loss and

- restoration of resilience of montane wetland ecosystems in the western US. *Frontiers in Ecology and the Environment* **12**:232–240.
- Saidapur SK, Hoque B. 1995. Effect of photoperiod and temperature on ovarian cycle of the frog *Rana tigrina* (Daud.). *Journal of Biosciences* **20**:445–452.
- Sánchez- Herrera Herencia F. 2002. La restauración ambiental de la antigua estación de esquí de Valcotos y el programa de conservación del Parque Natural de Peñalara. Segundas Jornadas Científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páular. Dirección General del Medio Natural, Madrid.
- Sarrazin F. 2007. Introductory remarks: a demographic frame for reintroduction. *Ecoscience* **14**:iii–v.
- Schlepper M, Hoover C, Dodd K. 2005. Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *BioScience* **55**:256.
- Schmeller DS, Blooi M, Martel A, Garner TWJ, Fisher MC, Azemar F, Clare FC, Leclerc C, Jäger L, Guevara-Nieto M, Loyau A, Pasmans F. 2014. Microscopic aquatic predators strongly affect infection dynamics of a globally emerged pathogen. *Current Biology* **24**:176–180.
- Scott DE, Casey ED, Donovan MF, Lynch TK. 2007. Amphibian lipid levels at metamorphosis correlate to post-metamorphic terrestrial survival. *Oecologia* **153**:521–532.
- Semlitsch RD. 2002. Critical elements for biologically based recovery plans of aquatic breeding amphibians. *Conservation Biology* **16**:619–629.
- Shepherdson DJ. 2012. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. *Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals*. Smithsonian Institution Press.
- Sibly RM, Atkinson D. 1994. How rearing temperature affects optimal adult size in ectotherms. *Functional Ecology* **8**:486.
- Silva JP, Toland J, Jones W, Eldridge J, Hudson T, O'Hara E. 2009. LIFE and Europe's reptiles and amphibians. *LIFE Focus*.
- Simón MA, Gil-Sánchez, JM, Ruiz G, Garrote G, McCain EB, Fernández L, López-Parra M, Rojas E, Arenas-Rojas R, Del Rey T, García-Tardío M, López G. 2012. Reverse of the decline of the endangered Iberian Lynx. *Conservation Biology* **26**:731–736.
- Smith-Gill SJ, Berven KA. 1979. Predicting amphibian metamorphosis. *The American Naturalist* **113**:563–585.
- Snyder NFR, Derrickson SR, Beissinger SR, Wiley JW, Smith TB, Toone WD, Miller B. 1996. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conservation Biology* **10**(2):338–348.
- Stevenson LA, Alford RA, Bell SC, Roznik EA, Berger L, Pike DA. 2013. Variation in thermal performance of a widespread pathogen, the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE* **8**:e73830.
- Stuart SN. 2012. Responding to the amphibian crisis: Too little, too late? *Alytes* **29**:9–12.
- Swanson WF. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* **66**:49–58.
- Székely D, Denoël M, Székely P, Cogălniceanu D. 2017. Pond drying cues and their effects on

- growth and metamorphosis in a fast developing amphibian. *Journal of Zoology* **303**:129–135.
- Tabachnick BG, Fidell LS. 2001. Discriminant function analysis. Using multivariate statistics:456–516.
- Tapley B, Michaels CJ, Johnson K, Field D. 2017. A global problem requires a global multifaceted solution. *Animal Conservation* **20**:122–123.
- Tarvin RD, Silva Bermúdez C, Briggs VS, Warkentin KM. 2015. Carry-over effects of size at metamorphosis in red-eyed treefrogs: higher survival but slower growth of larger metamorphs. *Biotropica* **47**(2):218–226.
- Tobler U, Schmidt BR. 2010. Within- and among-population variation in chytridiomycosis-induced mortality in the toad *Alytes obstetricans*. *PLoS ONE* **5**:1–8.
- Trenham PC, Marsh DM. 2002. Amphibian Translocation Programs : Seigel Reply. *Conservation Biology* **16**:555–556.
- Valbuena-Ureña E, Soler-Membrives A, Steinfartz S, Alonso M, Carbonell F, Larios-Martín R, Obon E, Carranza S. 2017. Getting off to a good start? Genetic evaluation of the *ex situ* conservation project of the critically endangered montseny brook newt (*Calotriton arnoldi*). *PeerJ* **5**:e3447.
- Venesky MD, Parris MJ, Storfer A. 2009. Impacts of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on tadpole foraging performance. *EcoHealth* **6**:565–575.
- Verrell PA, Brown LE. 1993. Competition among females for mates in a species with male parental care, the midwife toad *Alytes obstetricans*. *Ethology* **93**:247–257.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Journal of Chemical Information and Modeling* **53**:1689–1699.
- Vredenburg VT. 2004. Reversing introduced species effects: Experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:7646–7650.
- Vredenburg VT, Briggs CJ, Harris RN. 2011. Host-pathogen dynamics of amphibian chytridiomycosis: the role of the skin microbiome in health and disease (pp. 342–355). Washington, DC: The National Academies Press.
- Walker SF, Bosch J, James TY, Litvintseva AP, Oliver Valls JA, Piña S, García G, Rosa GA, Cunningham AA, Hole S, Griffiths R, Fisher MC. 2008. Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology* **18**:853–854.
- Walls SC, Ball LC, Barichivich WJ, Kenneth Dodd C, Enge KM, Gorman TA, O'Donnell KM, Palis JG, Semlitsch RD. 2017. Overcoming challenges to the recovery of declining amphibian populations in the United States. *BioScience* **67**:156–165.
- Wells E, García-Alonso D, Rosa GM, García G, Tapley B. 2015. Amphibian taxon advisory group best practice guidelines for midwife toads (*Alytes* sp.):1–53.
- Wilbur HM. 1977. Interactions of food level and population density in *Rana sylvatica*. *Ecology* **58**:206–209.
- Wilbur HM, Collins JP. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis **182**:1305–1314.
- Williams SE, Hoffman EA. 2009. Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: A

- review. *Biological Conservation* **142**:2388–2400.
- Willoughby JR, Ivy J a., Lacy RC, DeWoody JA. 2017. The effects of inbreeding and selection on genomic diversity in captive populations: implications for the conservation of endangered species. *PLoS ONE* **12**:1–17.
- Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S, Davis LR, Lauer A, Muths E, Puschendorf R, Schmidt BR, Sheafor B, Voyles J. 2011. Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in zoology* **8**:8
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms* **55**:65–67.
- Woodhams DC, Geiger CC, Reinert LK, Rollins-Smith LA, Lam B, Harris RN, Briggs CJ, Vredenburg VT, Voyles J. 2012. Treatment of amphibians infected with chytrid fungus: Learning from failed trials with itraconazole, antimicrobial peptides, bacteria, and heat therapy. *Diseases of Aquatic Organisms* **98**:11–25.
- WWF. 2012. Red Natura 2000 en España: situación por comunidades autonomas. Madrid.
- Young S, Berger L, Speare R. 2007. Amphibian chytridiomycosis: Strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook* **41**:85–95.
- Zeisset I, Beebee TJC. 2013. Donor population size rather than local adaptation can be a key determinant of amphibian translocation success. *Animal Conservation* **16**:359–366.
- Zippel K, Johnson K, Gagliardo R, Gibson R, McFadden M, Browne R, Martínez C, Townsend E. 2011. The amphibian Ark: A global community for *ex situ* conservation of amphibians. *Herpetological Conservation and Biology* **6**:340–352.

RESUMEN

La biodiversidad está en declive mundialmente y los anfibios no son una excepción (Collins & Storfer 2003; McCallum 2007). Especialmente alarmante es el declive en áreas bien protegidas, donde su desaparición debería haber sido mucho menor (Stuart 2004; Lips *et al.* 2005). Una de estas paradojas sucede en el área montañosa del Macizo de Peñalara (dentro el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama en Madrid, España). Por una parte, la población del sapo partero común, *Alytes obstetricans*, Laurenti 1768, disminuyó tras la introducción del hongo patógeno quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*, Longcore, Pessier y Nichols 1999, responsable de la quitrimiomycosis. Por otra parte, la población de rana patilarga, *Rana iberica*, descrito por Boulenger en 1879, entró en declive tras la introducción en los arroyos del Macizo para la pesca deportiva de dos salmónidos: el salvelino, *Salvelinus fontinalis*, Mitchill 1814, especie alóctona; y la trucha común, *Salmo trutta*, especie descrita por Linneo en 1758 e autóctona pero cuya distribución en el Macizo estaba limitada (Bosch *et al.* 2001, 2006b). La dramática situación de ambas poblaciones de anfibios hizo patente la necesidad de comenzar un programa de cría en cautividad de ambas especies con el fin de producir ejemplares para reintroducir en el Macizo de Peñalara.

Por ello, entre los años 2008 y 2012 se desarrolló el programa de cría en cautividad en el Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama, localizado en Rascafría, Madrid, a 15 kilómetros del Macizo. Para tal fin, se realizaron experimentos destinados a analizar, por un lado, la influencia de la densidad, los refugios, el Itraconazol, un antifúngico, y el aporte de agua en el crecimiento y supervivencia larvario y juvenil; y, por otro, a desarrollar un método de cría que minimizase el esfuerzo humano necesario en la cría en cautividad. De igual modo, para el sapo partero común, se desarrolló con éxito un programa de reproducción *ex situ*, donde se estudió la influencia de la hibernación en la estimulación sexual- que no la hubo- así como una función discriminante para poder discernir machos de hembras, ya que la especie carece de dimorfismo sexual patente. Así mismo, se estudió la efectividad de las temperaturas elevadas y de un antifúngico, el Itraconazol, en el tratamiento *in situ* de la quitridiomycosis en larvas de sapo partero común. El tratamiento a concentraciones de 0.0001% consiguió eliminar la infección en el 89% de las larvas infectadas, mientras que el tratamiento con temperaturas elevadas consiguió eliminarlo en el 45% de los ejemplares. Por último, se evaluó la calidad de los ejemplares producidos en el Centro de Cría a través de reintroducciones en el Macizo de Peñalara. En el caso de la rana patilarga se realizó, previo a la liberación de ejemplares, un estudio del microhábitat que emplea en sus diferentes estadios de desarrollo de

la rana patilarga, en el que el 75% de las observaciones de juveniles, larvas y adultos estaban concentrados en pozas de caída. Paralelamente a las reintroducciones, se continuó con los esfuerzos de pesca eléctrica, consiguiendo prácticamente erradicar los salvelinos del Macizo de Peñalara en el 2012. Desde entonces, la rana patilarga se reproduce con normalidad en los arroyos donde se reintrodujo, mientras que el sapo partero común se reprodujo un único año, no habiéndose observado reproducción en años sucesivos.

Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados son las siguientes:

1. Se han establecido protocolos de trabajo en la cría en cautividad tanto para *A. obstetricans* como para *R. iberica*.
2. El tratamiento *in situ* recomendado contra la quitridiomycosis en *A. obstetricans* es el Itraconazol a una concentración de 0.0001%.
3. Se ha mejorado la viabilidad *in situ* de los ejemplares criados en cautividad de *R. iberica* mediante la aplicación de los protocolos desarrollados.
4. Se ha desarrollado un método de reproducción en cautividad de *A. obstetricans* con éxito en la que la hibernación, pese a ser una población de alta montaña, no es necesaria.
5. Se ha implementado con éxito un sistema de cría en cautividad de *A. obstetricans* en el que se recomienda que los recién metamórficos permanezcan en las cajas colectivas.
6. Se han producido con éxito ejemplares de *A. obstetricans* y *R. iberica* que han sobrevivido tras su reintroducciones.

ABSTRACT

The biodiversity is declining worldwide and amphibians are not escaping from these general losses (Collins & Storfer 2003; McCallum 2007). Especially disturbing are the declines in well protected areas where it should be lower (Stuart 2004; Lips *et al.* 2005). One of these paradoxes occurs in the montane area of Peñalara Massif (Sierra de Guadarrama National Park, Madrid, Spain). From one side, the common midwife toad population, *Alytes obstetricans*, Laurenti 1768, in Peñalara Massif declined after the chytrid fungus disease introduction, caused by *Batrachochytrium dendrobatidis*, Longcore, Pessier y Nichols 1999. From another side, the Iberian frog population, *Rana iberica*, Boulenger 1879, declined after introduction of two salmonids for recreational fishing: the allochthonous brook trout, *Salvelinus fontinalis*, Mitchell 1814, and the brown trout, *Salmo trutta*, Linneo 1758, which is an autochthonous species but its distribution in the Massif was limited (Bosch *et al.* 2001, 2006b). The dramatic situation in the Peñalara Massif required the implementation of the recovery program of both species, with the aim of producing exemplars to be released back in the Peñalara Massif.

Between 2008 and 2012, the captive rearing program was developed in the "Centro de Cría en Cautividad de Anfibios Amenazados de la Sierra de Guadarrama" facilities, located in Rascafría, Madrid, 15 kilometres away from the Massif. There were developed several experiments in order to analyse the influence of density, shelter, an antifungal drug and water supply in larvae and juvenile survival and growth rates, and also in order to minimize the human economic cost. Also it was successfully developed an *ex situ* reproduction program for the common midwife toad, in which a hibernation period did not trigger adult sexual behaviour (despite it is a montane population), and also it was applied a discriminant function to identify males and females, because in the species there are no sexual dimorphism. In addition, it was studied in the common midwife toads tadpoles the effectiveness of elevated temperatures and the Itraconazol, an antifungal drug, as an *in situ* treatment against chytridiomycosis. The treatment of 0.0001% cleared 89% of the larvae infection, meanwhile the temperature treatment achieved a 45% of success. Finally, the quality of the cohorts produced was evaluated through reintroduction events in the Peñalara Massif. In the Iberian frog case, before the release started, a microhabitat use by the different development stages study was performed, in which 75% of juveniles, larvae and adults were located in pools. Besides these efforts, the electrofishing campaigns continued, eliminating most of the brook trout population of the Massif in 2012. Since then, the Iberian frog reproduce habitually, and only one reproduction event was observed in the common midwife toad reintroduction localities.

The conclusion that can be made in behalf of the results are the following:

1. It has been established working protocols for *A. obstetricans* and *R. iberica*.
2. The recommended *in situ* treatment against the chytridiomycosis disease is Itraconazole at 0.0001% concentration.
3. It has been improved the *in situ* viability of the exemplars reared in captivity of *R. iberica* throughout the application of the developed protocols.
4. It has been developed a successfully reproduction protocol in which hibernation, despite the mountainous origin of the population, is not necessary.
5. It has been successfully implemented a rearing protocol for *A. obstetricans*, in which newly metamorphosed should be maintained in collective's boxes.
6. It has been successfully produced exemplars of *A. obstetricans* and *R. iberica* that have survived after their reintroductions.